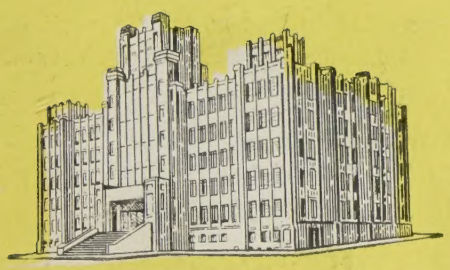
Vol. 26 1959

ARQUIVOS

DO

INSTITUTO BIOLÓGICO

• Departamento de Defesa Sanitária da Agricultura •



SECRETARIA DA AGRICULTURA
SÃO PAULO
BRASIL

Os Arquivos do Instituto Biológico aparecem sob a forma de artigos separados publicados à medida de sua apresentação, os quais anualmente são reunidos em um volume, que pode ser adquirido por permuta ou compra pelo preço marcado na capa.

Os artigos separados, impressos em número limitado, poderão ser adquiridos ao preço de Cr$ 20,00 no Serviço de Vendas do Instituto Biológico.

Tôda a correspondência referente aos Arquivos deve ser dirigida ao Diretor Geral do Instituto Biológico, (Departamento de Defesa Sanitária da Agricultura) Caixa postal 7119, São Paulo, Brasil.

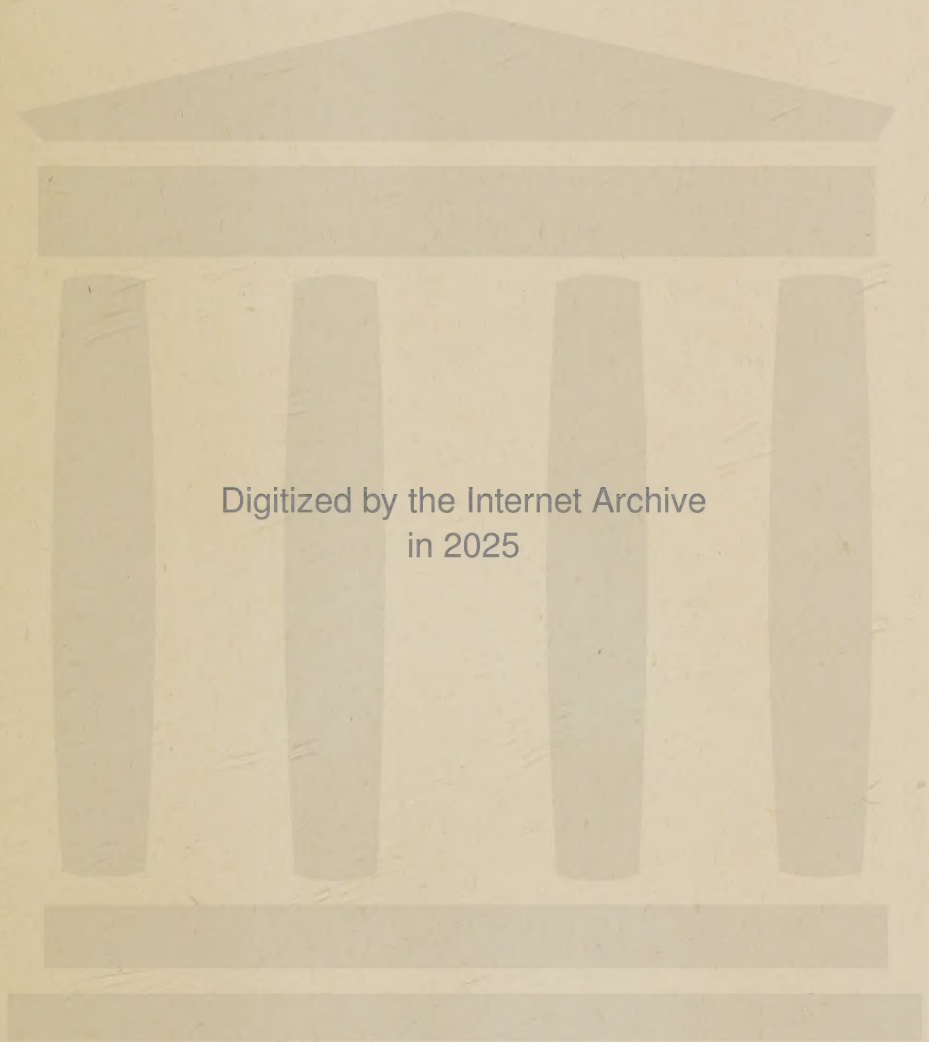
Diretor Geral: Paulo Nóbrega

The "Arquivos do Instituto Biológico" appear in the form of separate articles published as they are presented, and are annually united in one volume, which may be acquired by exchange or purchase at the price indicated on the cover.

The separate articles may be purchased for US $ 0,20 from the Serviço de Vendas of the Instituto Biológico.

All correspondence referring to the "Arquivos" should be addressed to - Diretor Geral do Instituto Biológico, P. O. Box 7119, São Paulo, Brazil.

PREÇO DÊSTE NÚMERO Cr$ 150,00



Digitized by the Internet Archive
in 2025

https://archive.org/details/arquivos-do-instituto-biologico_1959_26

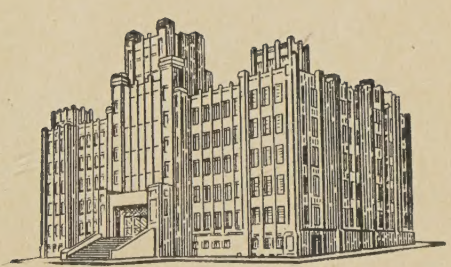
Vol. 26 1959

ARQUIVOS

DO

INSTITUTO BIOLÓGICO

• Departamento de Defesa Sanitária da Agricultura •



SECRETARIA DA AGRICULTURA
SÃO PAULO
BRASIL

SUMÁRIO

Págs.

1. **Schwarz, K.** — A DECOMPOSIÇÕO ESPONTÂNEA DE ALGUNS DERIVADOS INDÓLICOS — III — NOVOS DADOS SÔBRE A DECOMPOSIÇÃO DO ÁCIDO INDOLPIRÚVICO. Com 2 figuras.
The spontaneous decomposition of some indole derivates — III — Further data on the decomposition of indolepyruvic acid 1-9

2. **Ciccarone, A.** — A ANTRACNOSE MACULADA DA AMENDOEIRA (*PRUNUS AMYGDALUS* BATCH), CAUSADA POR *SPHACELOMA SICULUM* N. SP. Com a estampa 1.
"Spot Anthracnose" of almond (Prunus amygdalus BATCH), *induced by Sphaceloma siculum* n. sp. 11-16

3. **Ciccarone, A. & Graniti, A.** — *ELSINOË OLEAE* N. SP., NOVO PARASITA DA OLIVEIRA (*OLEA EUROPAEA* L.). Com as estampas 2 e 3.
Elsinoë oleae n. sp., a new parasite of the olive-tree (Olea europaea L.) 17-21

4. **Meyer, J. R.** — EXPERIÊNCIAS SÔBRE O EFEITO DA SUB-ALIMENTAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE UM ADENOCARCINOMA TRANSPLANTÁVEL DO CAMUNDONGO. Com 2 tabelas.
Experiments on the effect of sub-nutrition on the development of a transplantable adenocarcinoma of the mouse 23-31

5. **Franco do Amaral, S., Puzzi, D. & Orlando, A.** — POLVILHAMENTO DO SOLO COMO MÉTODO DE COMBATE À BROCA DO CAFÉ. Com as estampas 4 a 6.
Soil dusting as a control method for the coffee berry borer .. 33-39

6. **Carvalho, J. C.** — DESCRIÇÃO DO MACHO DE *SCUTELLONEMA BOOCKI* — (NEMATODA: TYLENCHIDAE). Com 1 figura.
Scutellonema boocki — Description of the male 41-44

7. **Carvalho, J. C.** — *HELICOTYLENCHUS ELISENSIS* N. COMB. — (NEMATODA: TYLENCHIDAE). Com 1 figura.
Helicotylenchus elisensis n. comb. — (Nematoda: Tylenchidae) 45-48

(CONTINUA)

Págs.

8. **Guida, V. O., Cintra, M. L., Santa Rosa, C. A., Caldas, A. D., Corrêa, M. O. & Natale, V.** — LEPTOSPIROSE SUINA PROVOCADA PELA *L. CANICOLA*, EM SÃO PAULO. *Swine leptospirosis by L. canicola, in São Paulo, Brazil* 49-54

9. **Andrade, S. O. & Holzhacker, E. L.** — INVESTIGAÇÕES SÔBRE PLANTAS TÓXICAS NO ESTADO DE SÃO PAULO. Com as estampas 7 a 14. *Investigations on toxic plants in the State of São Paulo, Brazil* 55-87

10. **Falanghe, O., Dias Netto, N. & Molinari Araújo, J. B.** — COMBATE À MARIPOSA ORIENTAL DAS FRUTAS — *GRAPHOLITHA MOLESTA* (Busck) — EM MARMELEIROS. Com 5 tabelas. *Control of Grapholitha molesta* (Busck) *on quince* 89-101

11. **Guida, V. O. & Forster, J. P.** — SÍNTESE DA RIBOFLAVINA POR *BACILLUS COAGULANS* E *B. SUBTILIS*. — Efeito da administração de suspensões dêsses microrganismos, por via oral, a ratos em carência experimental. *Studies on the riboflavin synthesis by B. coagulans and B. subtilis — Effects of administration of suspensions of these microorganisms, by oral route, to rats subjected to experimental avitaminosis* 103-108

12. **Guida, V. O., Santa Rosa, C. A., D'Apice, M., Corrêa, M. O. & Natale, V.** — PESQUISA DE AGLUTININAS ANTI-LEPTOSPIRA NO SÔRO DE BOVINOS DO ESTADO DE SÃO PAULO. Com 1 tabela. *Research of the agglutinins against leptospires in the bovine serum, in the State of São Paulo, Brazil* 109-117

13. **Rossetti, V. & Salibe, A. A.** — EXPERIÊNCIAS SÔBRE O CONTRÔLE DA LEPROSE EM CITRUS. Com as estampas 15 e 16, 1 tabela e 4 figuras. *Experiments on the control of leprosis of citrus* 119-130

14. **Giannotti, O. & Marques de Sá, L.** — NOVO MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA A LOCALIZAÇÃO, NA CROMATOGRAFIA EM PAPEL, DE INSETICIDAS DO GRUPO DOS ÉSTERES DO ÁCIDO TIOFOSFÓRICO. *A new method for locating, in paper chromatography, insecticides of the thiophosphate esters group* 131-137

(CONTINUA)

Págs.

15. **Almeida, N. F. & Piedade, J. R.** — OS MÉTODOS DE KJELDAHL E DUMAS NA DOSAGEM DOS DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NITROGENADAOS. Com 1 tabela.
Kjeldahl and Dumas methods for the analysis of nitrogen containing pesticides 139-151

16. **Pigatti, A. & Orlando, A.** — TRATAMENTO DE TUBÉRCULOS DE BATATINHA COM INSETICIDAS SISTÊMICOS PARA O CONTRÔLE DE PULGÕES (*HOMOPTERA: APHIDIDAE*). Com 2 tabelas.
Potato tuber treatments with systemic insecticides for aphid control (Homoptera: Aphididae) 153-160

17. **Pigatti, A.** — ENSAIOS DE CONTRÔLE DA LAGARTA-RÔSCA — *AGROTIS YPSILON* (ROT.) — COM INSETICIDAS ORGÂNICOS MODERNOS (*LEPIDOPTERA: NOCTUIDAE*). Com a estampa 17 e 2 tabelas.
Screen tests with several insecticides for the control of Agrotis ypsilon (ROT.) *(Lepidoptera: Noctuidae)* 161-166

18. **Esteves, Maria Brazil** — APLICAÇÃO DA REAÇÃO DE IMUNOADERÊNCIA À TIPIFICAÇÃO DO VÍRUS AFTOSO. Com 5 tabelas.
Typification of foot and mouth disease virus by the immune-adherence technique 167-175

19. **Ciccarone, A., Black, W. & Bastos Cruz, B. P.** — OBSERVAÇÕES PRELIMINARES SÔBRE AS RAÇAS DE *PHYTOPHTHORA INFESTANS* NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL.
Preliminary observations on the races of Phytophthora infestans in the State of São Paulo, Brazil .. 177-184

20. **Campacci, C. A. & Oliveira Santos, C. F.** — FUNGICIDAS PARA CONTRÔLE DA "QUEIMA DA FÔLHA" DE BATATINHA. Com a estampa 18.
Fungicides for the control of "early blight" of potato 185-195

21. **Puzzi, D., Orlando, A. & Otero M., G.** — ENSAIOS DE LABORATÓRIO PARA O CONTRÔLE DA COCHONILHA VERDE DO CAFÉ — *COCCUS VIRIDIS* (GREEN) — COM EMPRÊGO DE DIVERSOS INSETICIDAS. Com 1 figura.
Laboratory tests with different insecticides for Green Scale — Coccus viridis (Green) — control 197-202

Vol. 26 — Artigo 1 Dezembro de 1959

A DECOMPOSIÇÃO ESPONTÂNEA DE ALGUNS DERIVADOS INDÓLICOS

III — NOVOS DADOS SÔBRE A DECOMPOSIÇÃO DO ÁCIDO INDOLPIRÚVICO(*)

POR

Käthe Schwarz(**)

Do Centro de Estudos sôbre o Câncer dos Vegetais
Instituto Biológico

Com 2 figuras no texto

INTRODUÇÃO

O ácido indolpirúvico (AIP) é uma substância extremamente instável. Cromatogramas de uma solução aquosa dêste composto mostram em geral, além da mancha original do próprio ácido, diversos "spots" de substâncias de decomposição (Bentley, Farrar, Housley, Smith & Taylor 1956, Schwarz & Bitancourt 1957b). Um dêstes spots destaca-se pelo fato de comportar-se como o spot original, tanto na cromatografia "dupla" (Schwarz & Bitancourt 1957 a e b) como nas reações coloridas. Sugerimos portanto, nessas publicações, que o AIP, um α-cetoácido, se apresenta, nos nossos cromatogramas, em duas formas, a forma enólica e a forma cetônica.

A separação dos tautômeros de um cetoácido ou de uma cetona pela cromatografia em papel parece um fato novo e suscitou dúvidas por parte de alguns pesquisadores.

Recentemente investigamos de mais perto o mecanismo desta tautomerização pela modificação do pH. A tautomerização lenta, provocada dessa maneira, foi acompanhada pela cromatografia (Schwarz & Bitancourt 1959). No presente trabalho apresentamos mais duas manifestações da tautomeria ceto-enólica do AIP, uma na cromatografia com níveis diferentes de pH (Bitancourt & Nogueira 1959) e outra em ionocromatogramas em que o ionograma, costurado entre duas tiras de papel filtro, é submetido a uma cromatografia (Bitancourt, Schwarz & Nogueira 1957).

Consignamos aqui os nossos agradecimentos ao Dr. A. A. Bitancourt pelo interêsse manifestado durante tôda a realização destas experiências e pelo auxílio prestado na redação do manuscrito.

(*) Recebido para publicação em 20 de maio de 1959.
(**) Bolsista de pesquisas do Conselho Nacional de Pesquisas.

CROMATOGRAFIA EM NÍVEIS DE pH DIFERENTES

Aplicaram-se num papel filtro três soluções: ácido cítrico 0,05 M, (pH vizinho de 2), tampão de fosfatos 0,1 M, de pH 7 e fosfato dissódico 0,1 M (pH vizinho de 8). As soluções foram aplicadas em linhas paralelas no sentido longitudinal do cromatograma, com uma pipeta capilar e uma régua, numa largura de 3 a 4 mm, com intervalo de 5 mm entre as linhas. A substância a cromatografar — uma solução de AIP a 1% — foi aplicada numa faixa de 4 mm de largura e 1 cm de extensão, no sentido da largura do cromatograma, ou seja, perpendicularmente às linhas de pH.

Os cromatogramas foram corridos em geladeira, na temperatura de aproximadamente 8º C, pelo método ascencional, até uma altura de 100 mm acima da linha de partida. Os solventes usados foram a água pura e a mistura acetona-água 8:2 v/v.

A fig. 1-A mostra um exemplo de cromatograma com água pura — que deu melhores resultados do que a mistura acetona-água — de uma solução recente de AIP. Para comparação representamos na mesma figura dois cromatogramas semelhantes, porém sem níveis diferentes de pH e com a atmosfera do recipiente saturada de vapores de ácido acético. O cromatograma da fig. 1-B é de uma solução de AIP decomposta por envelhecimento e o da fig. 1-C, de uma solução recente. Foram representados os contornos dos spots visíveis à luz ultravioleta de onda longa (lâmpada Mineralight 3660).

Três spots são visíveis no cromatograma da fig. 1-A. O de número 2 acha-se mais ou menos sôbre a linha de aplicação do ácido cítrico. Êle tem fluorescência roxa e Rf 0,15. O spot marcado 3 e 2′ encontra-se mais ou menos sôbre a linha onde foi aplicado o fosfato dissódico. Examinado com luz ultravioleta de onda curta (lâmpada Mineralight 2560), verificou-se que a maior parte do spot, em tôda a sua parte inferior (3), apresentava-se como uma mancha escura, em conseqüência da extinção da fluorescência azul do papel. O quarto superior (2′) do spot tinha, além disso, fluorescência azul, visível com luz fluorescente de onda longa. Um "rabo" com a mesma fluorescência une o spot 3 com o spot 2.

O terceiro spot (4, 4′, 5) ocupa a parte superior do cromatograma, e tem forma irregular, com uma área alongada, por cima da linha de pH 7 (4), reunida na parte superior a outra área situada sôbre a linha do fosfato dissódico (4′). Êste spot tem fluorescência azul salvo na parte superior direita (5) que tem fluorescência amarela.

Comparando os cromatogramas da fig. 1-A, B e C, vê-se que o spot 2 é o único que se apresenta na cromatografia de uma solução

recente de AIP (fig. 1-C). Trata-se, evidentemente, do próprio AIP. Consideramos a parte superior (2′) do spot intermediário (2′-3) do cromatograma da fig. 1-A, assim como o "rabo" que o une ao spot 2, como pertencente à mesma substância que êste último, isto é, o AIP. Com efeito, o spot 2′, quando cromatografado em segunda dimensão num solvente ácido (água pura em atmosfera saturada de vapores

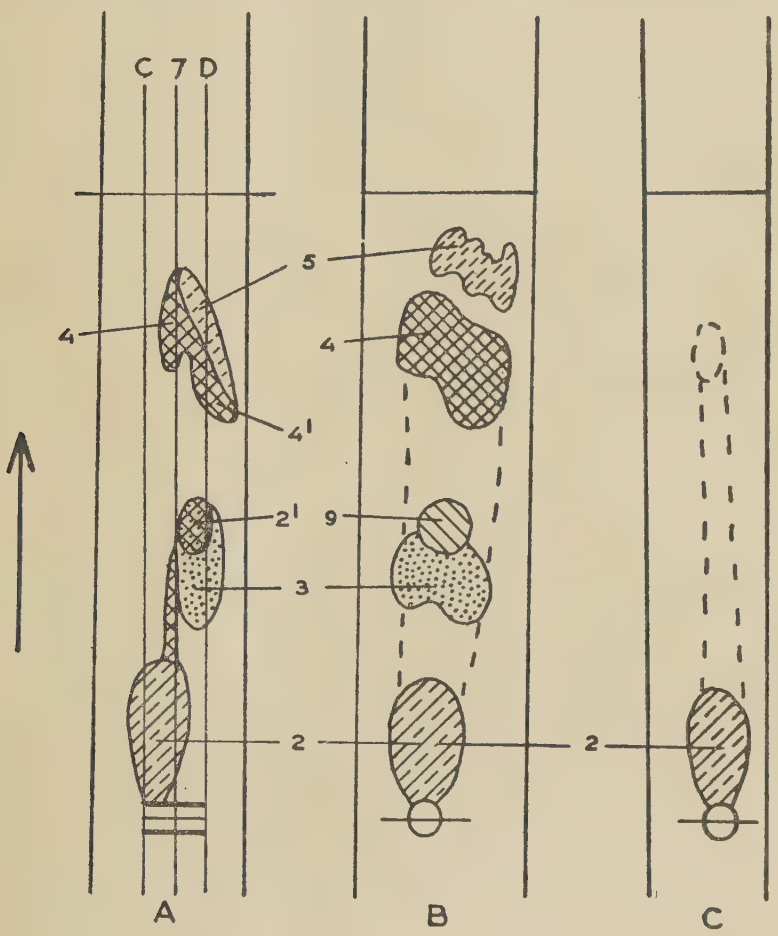


Fig. 1 — Cromatogramas ascendentes de soluções de ácido indolpirúvico a 1%, usando-se água como solvente. **A**, solução recente aplicada numa banda transversal de 1 cm de extensão e 0,5 de largura; ao longo das linhas verticais, marcadas C, 7 e D, foram aplicadas, com uma pipeta capilar, soluções 0,1 M de ácido cítrico, tampão de fosfatos de pH 7 e fosfato dissódico, respectivamente. **B**, solução decomposta por envelhecimento. **C**, solução recente. Os cromatogramas **B** e **C** foram corridos em recipientes saturados de vapores de ácido acético. Todos os cromatogramas foram efetuados em geladeira (8° C) e corridos numa extensão de 100 mm. As hachuras indicam as côres aproximadas de fluorescência e a absorção de luz ultravioleta de acôrdo com as convenções da fig. 2.

de ácido acético), produz um spot com todos os caracteres do spot 2 (Rf 0,15 e fluorescência roxa). Ao passo, portanto, que o AIP no pH baixo (linha do ácido cítrico) tem fluorescência roxa e, na água, um Rf de 0,15, essa substância no pH elevado (linha do fosfato dissódico) tem fluorescência azul e Rf de 0,47.

O spot 4, apenas assinalado por leve dilatação na extremidade do rabo de fluorescência azul no cromatograma de uma solução recente (fig. 1-C) é bem visível como um spot um tanto irregular no de uma solução decomposta (fig. 1-B). Vê-se que êle não aparece do lado ácido do cromatograma da fig. 1-A. Os spots 2 e 4, cujos caracteres foram dados numa tabela de outra publicação (SCHWARZ & BITANCOURT 1959), foram considerados como representando a forma enólica (spot 2) e a forma cetônica (spot 4) do AIP.

Os spots 3 e 5 dos cromatogramas das figs. 1-A e 1-B foram descritos anteriormente como substâncias de decomposição do AIP (SCHWARZ & BITANCOURT 1957b). O spot 3, em particular, apresenta as reações dos aldeídos, em eletroforese, como veremos abaixo, migra para o lado catódico e permanece na fração neutra dos extratos etéreos fracionados.

IONOCROMATOGRAFIA

Designamos por ionocromatografia a operação que consiste em realizar sucessivamente uma eletroforese e uma cromatografia, ou vice-versa (BITANCOURT, SCHWARZ & NOGUEIRA 1957). Para isto a tira de papel da primeira operação é costurada entre duas tiras de papel filtro para permitir que seja efetuada a segunda operação em sentido perpendicular à primeira. A fig. 2-A mostra o aspeto de um ionocromatograma terminado, com a tira do ionograma da primeira operação entre duas costuras (indicadas em traços interrompidos) que a prendem entre duas fôlhas de papel filtro destinadas à segunda operação ou cromatografia. A fôlha inferior permite mergulhar o ionocromatograma no solvente e na fôlha superior faz-se a cromatografia pròpriamente dita. Vê-se na fig. 2-A que a eletroforese foi feita no sentido horizontal do ionocromatograma e a cromatografia no sentido vertical, de baixo para cima. Para comparação foi apresentado um cromatograma unidimensional de AIP com solvente acetona-água (fig. 2-B).

No caso dêsse ionocromatograma foi utilizada uma solução de AIP decomposta por envelhecimento, aplicada entre as duas linhas verticais assinaladas por um O. A eletroforese com diferença de po-

tencial de 140 volts, foi feita em tampão de fosfatos 0,1 M, de pH 7 e durou 7 horas.

Estão indicados na fig. 2-A os polos do ionograma. No ionograma completado, examinado em luz ultravioleta, foram indicados com lápis de grafite os limites das diversas bandas fluorescentes, limites êsses indicados na fig. 2-A por traços verticais.

A cromatografia, pelo método ascendente, foi feita com o solvente acetona-água, 8:2 v/v, com o recipiente saturado de vapores de ácido acético, colocado dentro de uma geladeira à temperatura de 8º C. O contôrno dos spots visíveis sob a luz ultravioleta depois da

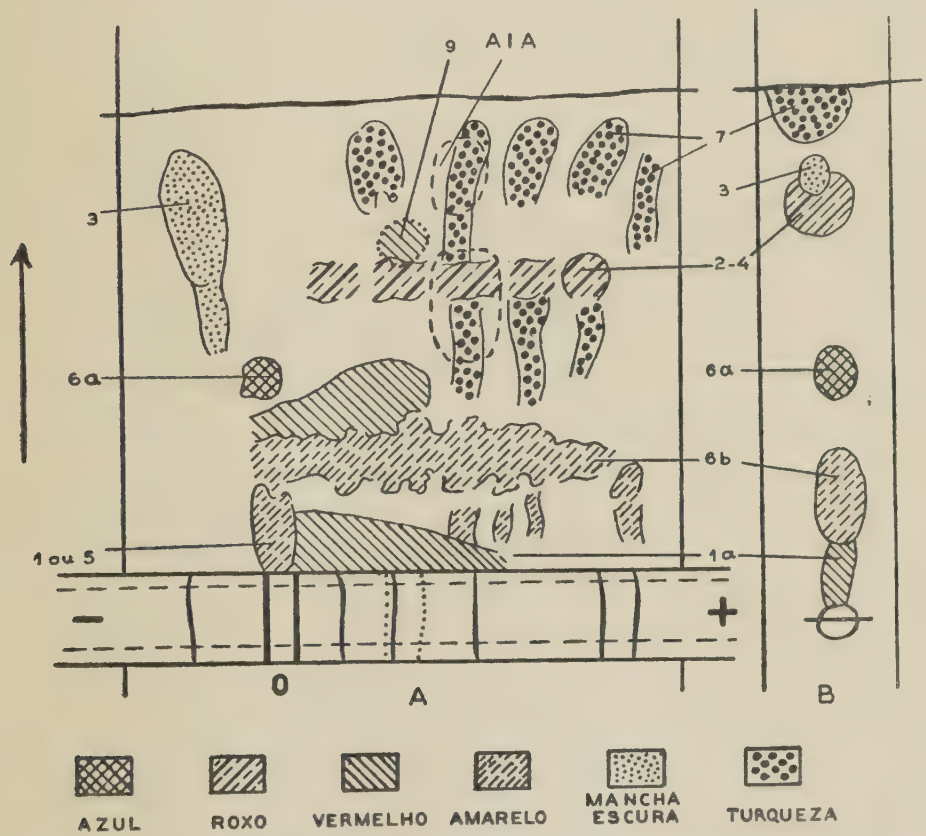


Fig. 2-A — Ionocromatografia de uma solução de AIP decomposta por envelhecimento. O ionograma foi costurado entre duas tiras de papel filtro, ao longo das linhas interrompidas. Os limites das zonas fluorescentes visíveis depois da eletroforese foram indicados por traços verticais. A cromatografia, em sentido ascendente, fêz-se com o solvente acetona-água (8:2 v/v) em atmosfera saturada de vapores de ácido acético. Fig. 2-B, cromatograma de uma solução de AIP decomposta por envelhecimento, usando-se o mesmo solvente. Ambos os cromatogramas foram corridos em geladeira, numa extensão de 100 mm. As hachuras convencionais indicam as côres aproximadas de fluorescência e a absorção de luz ultravioleta.

cromatografia assim como as côres aproximadas de fluorescência estão indicados na fig. 2-A. No lado esquerdo do cromatograma, correspondente ao lado catódico do ionograma, há uma única mancha alongada no sentido da cromatografia, com os caracteres (fluorescência, absorção da luz ultravioleta de onda curta, testes coloridos e Rf) da substância 3 nos cromatogramas dos produtos de decomposição do AIP em acetona-água (SCHWARZ & BITANCOURT 1957b). Da faixa de aplicação da solução do AIP no ionograma, assinalada por dois traços verticais acima de um O, destacaram-se, pela cromatografia, dois spots de fluorescência de côr turqueza e azul, respectivamente, correspondentes às substâncias 1 (ou 5?) e 6a dos nossos cromatogramas em acetona-água (SCHWARZ & BITANCOURT *loc. cit.*). Na mesma parte do cromatograma iniciam-se igualmente algumas das bandas de que falaremos a seguir.

Na parte do cromatograma correspondente ao lado anódico do ionograma há um número considerável de manchas, mas um certo número delas forma grupos de spots distribuidos horizontalmente, todos com a mesma côr de fluorescência, o que indica que cada grupo corresponde a uma só substância. São os alinhamentos horizontais de spots, coalescentes ou não em bandas horizontais, que ocupam o lugar das substâncias 7, 2 ou 4, 6b e 1a dos nossos cromatogramas em acetona-água (fig. 2-B). A linha de spots correspondente à substância 7 apresenta 5 spots individuais, alguns dêles com "rabo".

Um pouco abaixo da linha de spots correspondente à substância 7, vê-se outra linha, composta de 5 spots, todos de fluorescência roxa, correspondentes às substâncias 2 ou 4 e portanto ao ácido indolpirúvico pròpriamente dito, quer na forma cetônica quer na enólica (SCHWARZ & BITANCOURT, *loc. cit.*). A banda transversal de contôrno irregular que parece provir da coalescência de diversos spots correspondentes à substância 6b, inicia-se, contràriamente às linhas de spots 7 e 2-4, na parte do cromatograma correspondente à faixa inicial do ionograma (O). É êste também o caso de duas manchas de fluorescência avermelhada, que, entretanto, contràriamente às primeiras, não se estendem até a extremidade do cromatograma, do lado anódico.

Além disso foram representadas na fig. 2-A três manchas de substâncias não fluorescentes. Uma delas indicada em traços pontilhados e com as hachuras convencionais da côr vermelha, tinha efetivamente esta côr, visível à luz natural. As duas outras, em traços interrompidos, tornaram-se visíveis depois da aplicação ao cromatograma do reagente de Salkowski (6 ml de cloreto férrico M/2, 100 ml

de ac. clorídrico, 200 ml de água) que nelas produziu uma coloração rósea. A primeira dessas substâncias, cuja migração no campo elétrico pode ser acompanhada durante a eletroforese, graças à sua coloração vermelha, corresponde à substância 9 dos nossos cromatogramas anteriores (Schwarz & Bitancourt 1957b). Uma das duas últimas, a de Rf mais elevado, é a substância 6c, ou seja o ácido indolacético e a terceira não encontra equivalência com qualquer das substâncias até o momento estudadas.

DISCUSSÃO

Nos trabalhos anteriores (Schwarz & Bitancourt 1957a, 1959) mostramos que o AIP apresenta-se em cromatogramas sob duas formas diferentes (spots 2 e 4) que, pelo fato delas se decomporem uma na outra e reagirem de modo quase idêntico com 7 reagentes para os grupos indólico, cetônico e enólico, devem ser consideradas como, respectivamente, as formas enólica e cetônica dessa substância.

Os resultados que acabam de ser apresentados indicam que em cromatogramas com níveis múltiplos de pH, possìvelmente quatro formas diferentes de AIP se manifestam, correspondentes aos spots 2, 2′, 4 e 4′. Do lado ácido do cromatograma, sôbre a linha de ácido cítrico, o cromatograma de uma solução fresca representado na fig. 1-A sòmente apresenta o spot 2, evidentemente uma forma não ionizada do AIP. Pelo seu aparecimento pràticamente solitário em cromatogramas de soluções recentes da forma enólica (fig. 1-C) consideramos o spot 2 como representando essa forma (Schwarz & Bitancourt 1959). Os 3 outros spots acham-se em cima das linhas de pH 7 e de fosfato dissódico e representam formas ionizadas do AIP. Êste ácido em soluções alcalinas pode assumir 3 formas ionizadas diferentes que são, na ordem da alcalinidade crescente das soluções: a forma enólica com carboxila ionizado, a forma cetônica, com carboxila ionizado e a forma enólica, com carboxila e o grupo em posição α ambos ionizados (G. F. Smith, comunicação pessoal). São possìvelmente estas 3 formas ionizadas que constituem os spots 2′, 4 e 4′.

Em resumo, pode-se dizer que em pH fortemente ácido o AIP conserva a forma enólica, não ionizada, e fica estável. De um pH levemente ácido em diante, com alcalinidade crescente, começam a tautomerização e a decomposição, conforme já foi acentuado em trabalho anterior (Schwarz & Bitancourt 1959) onde o processo de tautomerização e decomposição de uma solução recente de AIP,* depois de alcalinizada, foi acompanhado nos primeiros 30′ por cromatogramas

de amostras tiradas de 5 em 5 minutos. O método de cromatografia em níveis múltiplos de pH permite por assim dizer visualizar num só cromatograma o processo de tautomerização num gradiente de alcalinidade crescente.

Êstes fatos acham-se em parte confirmados pela ionocromatografia. Vê-se, na fig. 2-A, que o AIP (banda 2-4) e pelo menos três dos seus produtos de decomposição (1a, 6b e 7) formam extensas bandas transversais que, no caso das bandas 2-4 e 7, resolvem-se em spots individualizados. Não podemos afirmar, entretanto, que tais spots não sejam na realidade artefatos, pois os pontos de costura que unem o ionograma ao cromatograma dividem a coluna ascencional do solvente durante a cromatografia e poderiam causar êsse efeito. A disposição dos spots em bandas transversais, porém, sòmente pode ser interpretada como resultado da decomposição do AIP durante a ionoforese para o caso das bandas 1a, 6b e 7, e como o de sua tautomerização, no da banda 2-4. Assim o ionocromatograma, como a cromatografia dupla e a cromatografia em níveis múltiplos de pH, indicaria o estado de equilíbrio entre as formas tautoméricas do AIP.

THE SPONTANEOUS DECOMPOSITION OF SOME INDOLE DERIVATIVES

III — FURTHER DATA ON THE DECOMPOSITION OF INDOLEPYRUVIC ACID

Abstract

In chromatograms with multiple pH levels (Bitancourt & Nogueira 1959), *with water as the solvent, indolepyruvic acid produces 4 spots (2, 2', 4 and 4', fig. 1-A). One, at the lower pH (approximately 2) has been considered to be the enol form in previous publications and is obviously in the undissociated form. Spots 2', 4 and 4', on the higher pH side of the chromatogram are ionized and should therefore each be one of the three possible ionized forms: the ionized enol form, the ionized keto form and the enol form ionized both at the carboxyl and at the group in the α-position.*

In ionochromatograms, in which the ionogram strip is machine sewed on to two strips of paper and chromatographed, using acetone-water (8:2) as the solvent (fig. 2-A), indolepyruvic acid (2-4) and two of its decomposition products, 6b and 7, form a row of spots or a band extending on a considerable portion of the anode side of the ionochromatogram. This is interpreted as being the result

of the keto-enol equilibrium established during electrophoresis at pH 7. Either the keto or the enol form has a greater velocity of migration in the electrical field and leaves behind it trails of the other form and of its decomposition products.

BIBLIOGRAFIA

BENTLEY, J. A., FARRAR, K. R., HOUSLEY, S., SMITH, G. F. & TAYLOR, W. C. — 1956 — Some chemical and physiological properties of 3-indolylpyruvic acid. *Biochem. J.*, **64**: 44-49.

BITANCOURT, A. A. & NOGUEIRA, A. P. — 1959 — Multiple pH levels in chromatograms. *Science*, **129**: 99.

BITANCOURT, A. A., SCHWARZ, K. & NOGUEIRA, A. P. — 1957 — A decomposição espontânea de alguns derivados indólicos. I. Métodos experimentais. *Arq. Inst. Biol.*, **24**: 169-182.

SCHWARZ, K. & BITANCOURT, A. A. — 1957a — Paper chromatography of unstable substances. *Science*, **126**: 607-608.

SCHWARZ, K. & BITANCOURT, A. A. — 1957b — A decomposição espontânea de alguns derivados indólicos. II. Ácido indolpirúvico. *Arq. Inst. Biol.*, **24**: 183-197.

SCHWARZ, K. & BITANCOURT, A. A. — 1959 — Further evidence of tautomerism in chromatograms of indole-3-pyruvic acid. *Biochem. J.* (no prelo).

Vol. 26 — Artigo 2 Dezembro de 1959

A ANTRACNOSE MACULADA DA AMENDOEIRA (*PRUNUS AMYGDALUS* BATCH.), CAUSADA POR *SPHACELOMA SICULUM* N. SP.* (1)

POR

Antônio Ciccarone
Da Universidade de Bari, Itália

Com a estampa 1

O fungo descrito no presente trabalho foi colhido no dia 16 de agôsto de 1957 em Piana degli Albanesi, nas proximidades de Palermo, na Sicília, sôbre amendoeira (*Prunus amygdalus* BATCH.) da variedade cultivada "Mollese". Êle parece comum na Sicília onde, às vêzes, é danoso ao hospedeiro. Provàvelmente o fungo não foi descrito até o presente momento, sòmente porque foi confundido com outros agentes patógenos.

O fungo forma, sôbre o limbo e pecíolos foliares e sôbre os ramos verdes, manchas uniformemente castanhas (com as tonalidades prevalentes de *Hay's maroon,* XIII, 1′, m(2) e *diamine brown,* XIII, 3′, m), freqüentemente mostrando um halo sêco, cinzento-violáceo (*hazel,* XIV, 11′, k, ou *chestnut,* XIV, 11′, m) (Est. 1, fig. A e B). Quando diversas manchas estão próximas, em particular nas margens e no ápice das fôlhas, o secamento dos tecidos em tôrno das manchas torna-se mais extenso e evidente. As manchas isoladas, de 0,5-2 mm de diâmetro, apresentam uma forma arredondada sôbre os ramos menores e sôbre o limbo das fôlhas; ao longo da nervura principal e sôbre os pecíolos, as manchas são alongadas. Elas interessam tôda a espessura do limbo foliar e por isto são visíveis em ambas as faces das fôlhas. Parece interessante lembrar que freqüentemente, em tôrno das manchas, não se formam, ou se formam sòmente tardiamente, camadas suberosas e que, conseqüentemente, as manchas não se perfuram com freqüência. Êste comportamento permite, nos casos típicos, distinguir, no campo, com certa facilidade, esta doença das outras alterações comuns da folhagem.

(*) Recebido para publicação em 26 de maio de 1959.

(1) Êste trabalho foi em parte elaborado no Instituto Biológico onde passei um sereno período de estudo de junho a novembro de 1958, como convidado do Conselho Nacional de Pesquisas. Agradeço vivamente à Doutora Anna E. Jenkins, do U. S. Department of Agriculture, Beltsville, Md., Estados Unidos, e ao Dr. A. A. Bitancourt, diretor da Divisão de Biologia Vegetal do Instituto Biológico, pelo interêsse que êles manifestaram pelo fungo descrito no presente artigo, assim como a êste último pela tradução do manuscrito para o português.

(2) As côres indicadas em grifo são tiradas de: Ridgway, R. Color standards and color nomenclature, 43 pp. ilus., Washington, D. C., 1912.

Sòmente nas margens ou no ápice das fôlhas, onde o secamento periférico das manchas é em geral mais extenso, é que caem os tecidos afetados; mas os furos que assim são produzidos, são irregulares, de forma que a fôlha pode então aparecer como dilacerada e ligeiramente assimétrica.

Vistas com grande aumento, as manchas mostram os bordos apenas salientes e, principalmente na face inferior das fôlhas, apresentam numerosos pontos escuros que permanecem por longo tempo cobertos pela cutícula. Êstes pontos são os acérvulos do parasita. As hifas de alimentação do fungo, hialinas e envoltas por uma mucilagem, apresentam, nas proximidades dos acérvulos, paredes bem definidas e leve coloração castanha. Aí elas medem 1,2-1,5 μ de diâmetro. Nas fôlhas, estas hifas são principalmente visíveis nas primeiras duas ou três camadas de células do tecido lacunoso, adjacente à epiderme inferior, células estas que estão repletas de goma e desfeitas. Os estromas prolíferos pròpriamente ditos formam-se por baixo da cutícula, medem 50-200 μ ou mais, particularmente quando são confluentes. Os conidióforos são numerosos, oliváceos até a extremidade (*brownish olive*, XXX, 19″, m), com um ou dois septos, estreitamente encostados uns nos outros e convergentes na parte superior, na direção da fissura do substrato.

Os conidióforos em repouso têm ápice obtuso; quando em atividade, o seu ápice se torna afilado. Os conidióforos medem 3,5-4,5 × 12-16 μ.

As conídias são elipsoidais, ovóides e por vêzes quase apiculadas, hialinas ou levemente amareladas; medem 1,2-3 × 3-6,5 μ. As conídias, quando se formam em câmara úmida, são freqüentemente gutuladas. Observam-se com facilidade conídias germinando por gemação.

Nas máculas foram por vêzes observadas por entre os acérvulos raros estromas externamente pretos, sub-circulares. Nêsses estromas, entretanto, não foram observados fenômenos de ascogênese, nem mesmo iniciais.

Em câmara úmida, os acérvulos, depois de 24 horas à temperatura ambiente, oscilando entre 20 e 30° C, perdem o seu aspecto sêco, escuro e definido, e, a princípio pelo alongamento dos conidióforos, depois pela produção de conídias, tornam-se aveludados e, em seguida, brancos, cerosos e luzentes.

A produção de conídias por gemação, nessas condições, se inicia depois de 48 horas; os acérvulos assumem, então, um aspecto mais pròpriamente mucoso (Est. 1, fig. C e E). Se, entretanto, a umidade

não alcançar a saturação, a penugem branquíssima, acima mencionada, acaba cobrindo os acérvulos. Em câmara úmida, depois de alguns dias, formam-se novos acérvulos nos tecidos do hospedeiro, também fora das manchas.

As colônias, sôbre ágar-batata-sacarose, são pulvinadas ou umbonadas, convolutas, com margens contínuas ou mais freqüentemente onduladas, e salientes, porém comprimindo levemente o meio de cultura. Estas colônias são inicialmente perláceas e cerosas, em seguida avermelhadas e cobertas de tênue penugem. Por vêzes, o micélio aéreo pode se apresentar com maior abundância nas culturas envelhecidas. Em tal caso, a côr da colônia se torna mais fraca (*flesh pink*, XIII, 5′, f). Outras vêzes, com o tempo, as colônias assumem uma tonalidade intensa (*Victoria lake*, I, 1, m, ou *maroon*, I. 3, m) que se difunde lentamente no meio de cultura. As colônias muito velhas apresentam-se com freqüência com superfície glabra, coriácea, escura (*warm blackish brown*, XXXIX, 1‴, m). Na realidade, nas culturas, as variações de côr e de aspecto geral das colônias dêste fungo pareceram tão numerosas que tornam de pouco interêsse insistir nelas. Deve-se tão sòmente lembrar que nas culturas conservadas em refrigerador, se diferenciaram com freqüência, áreas pretas (vêr, a propósito: Bitancourt & Jenkins, 1940), que em seguida puderam ser multiplicadas indefinidamente.

Sôbre amendoeira já foi descrita, em Sardenha, uma "antracnose" causada por *Gloeosporium amygdalinum* Brizi (Brizi 1896) ([3]). Êste fungo, porém, é mais freqüente nas frutas que nos ramos, não ataca as fôlhas, é sub-epidérmico, apresenta conídias de 15-20 × 4-5 μ, dá lugar a colônias chatas, circulares, pequenas, com uma franja de micélio branco em tôda a periferia e não parece apresentar conídias que germinam por gemação. Em cultura líquida em solução de sacarose a 40%, o fungo forma conidióforos livres como os Hifomicetos. *G. amygdalinum* parece, portanto, não se aproximar do gênero *Sphaceloma*.

Sôbre Rosáceas, entretanto, existe mais de uma espécie do gênero *Sphaceloma*. Miss Anna E. Jenkins (em carta de 4 de novembro de 1957) me fêz notar, a êsse propósito, a semelhança dos acérvulos de *Sphaceloma rosarum* (Pass.) Jenkins, com o fungo objeto da presente nota.

---

(3) A êste fungo alude Miss Anna E. Jenkins (1932) por causa de sua possível relação com o gênero *Elsinoe*, uma vez que Brizi (*loc. cit.*) aproxima a "antracnose" da amendoeira à mesma doença, da videira. Êste autor, entretanto, se refere vagamente por esta aproximação, aos sintomas que as duas alterações produzem sôbre as bagas da videira e sôbre o epicarpo da amêndoa. Êle não examina mais detalhadamente as duas doenças, e, em particular, os caracteres dos dois fungos que as produzem.

Sôbre o gênero *Prunus* teria sido assinalado *Elsinoë piri* (Wor.) Jenkins em Criméia (Garbowski, 1924, sob o nome de *Hadrotrichum populi* Sacc.; Jenkins 1932); do fungo de Garbowski, entretanto, não existem exemplares (Jenkins 1942).

Sphaceloma spp., em seguida foram assinalados sôbre *P. virginiana* L. (Jenkins 1942), *P. lyonii* Sarg., *P. ilicifolia* Walp. (Jenkins, Bitancourt & Pollack 1946) e sôbre *P. domestica* L. (Bitancourt & Jenkins, 1948). Estas espécies infelizmente, não foram descritas, embora a última tenha sido considerada como provàvelmente pertencente a *E. piri.*

Ao contrário, foi detalhadamente descrito *E. pruni* Jenkins (Jenkins 1947) sôbre *P. capuli* Cav. de proveniência venezuelana.

Esta espécie, de que examinei uma exsicata (4), apresenta alguns caracteres que a aproximam do fungo encontrado sôbre amendoeira, (como o fácil alongamento dos conidióforos sôbre o estrato paliforme) e outros que a diferenciam do mesmo; tais são as dimensões das conídias (15 × 2,6-5 μ em *E. pruni*), o aspecto geral e a côr cinza das manchas, o fato de ser o fungo de *P. capuli* essencialmente epífilo (as manchas da amendoeira são anfígenas), a posição conseqüentemente epífila das frutificações (na amendoeira elas são, na natureza, hipófilas; os acérvulos epífilos aparecem tardiamente e especialmente em câmara úmida). No fungo de *P. capuli,* além disto, as manchas que alcançam a nervura principal não se estendem ao longo desta última e permanecem circulares.

O fungo encontrado sôbre amendoeira, portanto, vem, por enquanto, descrito como espécie nova com a seguinte diagnose:

Sphaceloma siculum n. sp.

Maculis, foliicolis, petiolicolis et ramulicolis; in foliis, amphigenis, numerosis, sparsis, interdum confluentibus, subrotundis, uniformiter rubro-brunneis, quadoque halonem siccum griseo-violaceum ostendentibus, mm 0,5-2 diam.; in petiolis et secus nervum medianum foliorum, elongatis. Acervulis brunneis, hypophyllis, demum etiam amphigenis, μ 50-200 diam., erumpentibus, sed cuticula diu tectis, subcircularibus vel parum elongatis; conidiophoris fusco-olivaceis dense aggregatis, numerosis, paliformibus, superne at-

(4) A exsicata é:
Instituto Biológico, São Paulo, Brasil
Herbário da Secção de Fitopatologia
Data de entrada: 23-6-1941 N.º 4194
Espécimen: fôlha
Hóspede: *Prunus serotina capuli*
Fungo principal: *Elsinoe pruni* Jenkins
Localidade: Caracas, Venezuela
Col. A. S. Muller Data da colheita: Mar. 1, 1941
Det. A. E. Jenkins

tenuatis, 1-2-septatis, μ 12-16 × 3-5; conidiis ellipsoideis, ovoideis, interdum apiculatis, hyalinis vel fuscidulis, facile gemmiparis, μ 3-6,5 × 1,2-3.

Hab. in foliis ramulisque vivis Pruni amygdali Batch. *(Rosaceae), prope Piana degli Albanesi (Sicilia).*

Typus in Instituto Biologico (São Paulo, Brasile (n. 9591) et co-typus in Instituto Phytopathologico Universitatis Barensis (Italia).

"SPOT ANTHRACNOSE" OF ALMOND (*PRUNUS AMYGDALUS* Batch.) INDUCED BY *SPHACELOMA SICULUM* N. SP.

Abstract

A new species of Sphaceloma (S. siculum) is described, which induces spots (usually non perforated) on leaves and twigs of Almond (Prunus amygdalus Batch.).

The fungus is rather common in Sicily and in a few locations, it is the dominant leaf-parasite of Almond.

The cultural characters of the pathogen are described and its latin diagnose is given.

BIBLIOGRAFIA

Bitancourt, A. A. & Jenkins, A. E. — 1940 — Novas espécies de "Elsinoë" e "Sphaceloma" sôbre hóspedes de importância econômica. *Arq. Inst. Biol.*, **2**: 45-58.

Bitancourt, A. A. & Jenkins, A. E. — 1948 — Supplementary notations relative to spot anthracnoses (Elsinoë and Sphaceloma) in Europe since 1936. *Phytopath.*, **38**: 2.

Brizi, U. — 1896 — Una nuova malattia (antracnosi) del Mandorlo. *Riv. Pat. Veg.*, 4. 11 pp.

Garbowski, L. — 1924 — Les micromycètes de la Crimée et des districts limitrophes de la Russie méridionale en considération spéciale des parasites des arbres et des arbrisseaux fruitiers. *Bull. Soc. Myc. France*, **39**: 227-260.

Jenkins, A. E. — 1932 — Elsinoë on Apple and Pear. *Journ. Agric. Res.*, **44**: 689-700.

Jenkins, A. E. — 1942 — A new species of Elsinoë on Capulin Cherry (*Prunus capuli*) (Abstract). *Phytopath.*, **32**: 11.

Jenkins, A. E. — 1947 — A new species of Elsinoë on capulin cherry (*Prunus capuli*). *Journ. Wash. Acad. Sc.*, **37**: 86-89.

JENKINS, A. E., BITANCOURT, A. A. & POLLACK, F. C. — 1946 — Spot anthracnoses in the Pacific Coast States. *Journ. Wash. Acad. Sc.*, **36**: 416-421.

RIDGWAY, R. — 1912 — Color standards and color nomenclature, Washington, D. C., 43 pp.

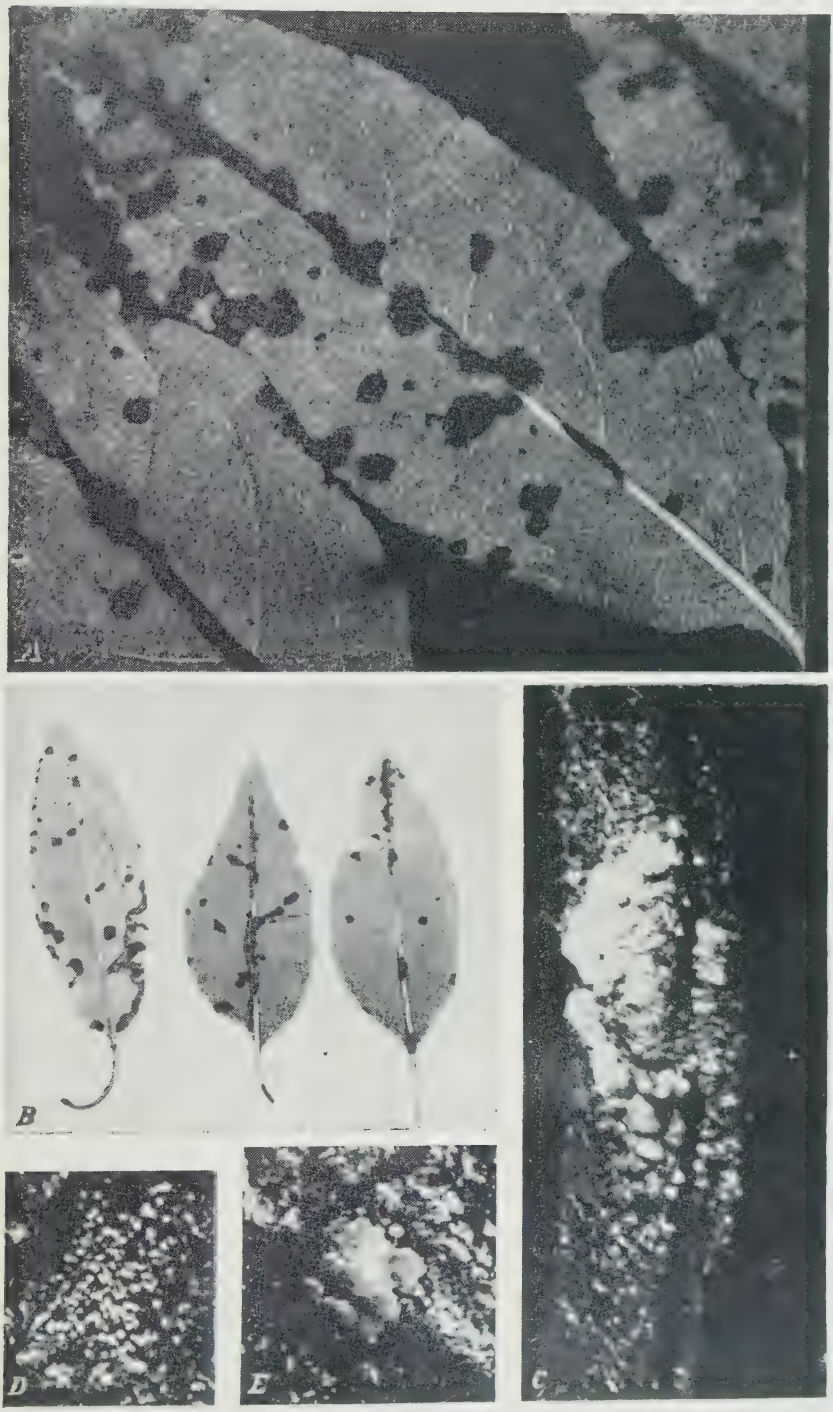
EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 1

Figs. A-B — Fôlhas de amendoeiro var. "Mollese", com manchas de *Sphaceloma siculum*. A. aumentado, B. tamanho natural.

Fig. C — Pecíolo com acérvulos de *S. siculum*, depois de 48 horas de permanência em câmara úmida, x 35.

Figs. D-E — Acérvulos de *S. siculum*, D depois de 24 horas de permanência em câmara úmida, x 20. E, os mesmos depois de 48 horas, x 20.


A
B
C
D
E

Vol. 26 — Artigo 3 Dezembro de 1959

ELSINOË OLEAE N. SP., NOVO PARASITA DA OLIVEIRA (*OLEA EUROPAEA* L.)* (1)

POR

Antônio Ciccarone e Antônio Graniti

Da Universidade de Bari, Itália

Com as estampas 2 e 3

O parasita(2) que é objeto da presente nota parece um tanto difundido na Sicília oriental, onde, ainda não apresenta importância econômica. Êle encontra-se nas fôlhas, pecíolos, ramos e frutas. Em todos êsses órgãos, as alterações que induz aparecem como manchas salientes, extremamente pequenas, punctiformes sôbre as frutas (Est. 2, fig. C), alongadas sôbre outros órgãos (Est. 2, fig. B), lineares sôbre a nervura principal das fôlhas (Est. 2, fig. A), de côr castanha amarelada (*raw-Sienna,* III, 17, i, a *raw amber,* III, 17, m(3)).

Nas fôlhas, as lesões são muito mais freqüentes; elas são observadas sòmente na nervura principal, na face inferior da fôlha, com dimensões de 0,1 a 0,5 mm de largura por 0,2 a 2 mm, ou muito mais, de comprimento.

Em secções transversais, os tecidos lesados apresentam-se contraídos e repletos de goma. Por baixo dos mesmos, a planta forma, em sucessão, camadas suberosas destinadas a isolar a parte afetada. Esta é, pouco a pouco, levantada, em conseqüência do acréscimo de tecido cicatricial, ou dos tecidos que a sustentam e não podendo acompanhar a distenção, se rompe (Est. 2, fig. E) (4).

(*) Recebido para publicação em 26 de maio de 1959.

(1) O presente trabalho foi em parte executado e preparado no Instituto Biológico onde o primeiro autor passou uma grata temporada de estudo de julho a novembro de 1958, como convidado do Conselho Nacional de Pesquisas.

Os autores agradecem vivamente à Dra. Anna E. Jenkins, colaboradora do U. S. Department of Agriculture, Beltsville, Md., Estados Unidos e ao Dr. A. A. Bitancourt, diretor da Divisão de Biologia Vegetal do Instituto Biológico, pelo interêsse que manifestaram pelo fungo descrito no presente trabalho, assim como a êste último pela tradução para o português.

(2) E' um grato dever dos autores lembrar que a presença de lesões não definidas, nas fôlhas de oliveira, foi inicialmente assinalada ao primeiro autor pelo Dr. L. J. Klotz, da Citrus Experiment Station, Riverside, Calif., Estados Unidos, no decurso de uma visita que há tempo fêz à Sicília.

(3) O nome das côres, em grifo é tirado de: Ridgway, R. 1912. Color standards and color nomenclature. 43 pp., 53 estampas, Washington, D. C.

(4) Outras espécies de *Elsinoe* (*E. bertholletiae* Bit., *Sphaceloma oleanderi* Thirum., por exemplo) induzem freqüentemente lesões na nervura principal das fôlhas. O fato de que, na oliveira, estas lesões se encontram tão sòmente nessa nervura, parece dever ser atribuído provàvelmente ao revestimento espêsso de pêlos peltados ou estrelados que cobre o hipófilo e impede o agente patógeno de entrar em contato com a epiderme. Sôbre a nervura, os pêlos são mais raros e além disto, caem fàcilmente, por causas mecânicas; deixam dêste modo, portanto, a epiderme exposta.

Nas lesões, o micélio do parasita é visível na epiderme e no colênquima, cujas paredes incham anormalmente nos tecidos alterados. O micélio hialino pode aglomerar-se densamente nas células epidermais, formando um paraplectênquima que permanece incolor por muito tempo e mostra-se constituído de minúsculos elementos poligonais irregulares, de 2,5 a 5 μ de diâmetro.

A espessa cutícula, que cobre tôdas as partes verdes desta xerófita, parece oferecer resistência sensível à erupção dos estromas, os quais, por conseguinte, para alcançar o meio exterior, diferenciam-se, aqui e ali, em massas escuras, de forma e dimensões variadas, mas aproximadamente tronco-cônicas, em correspondência das quais parecem de preferência diferenciar-se pouco conidióforos pluriseptados (em regra com 3 septos), constritos na altura dos septos, foscos, em forma de paliçada, estreitamente encostados uns nos outros, de 3-4 × 10-14 μ. (Est. 2, fig. D).

As conídias, elipsoidais, ovóides ou subesféricas, hialinas ou levemente fuscas, são muito raras. Medem 2-3,5 × 3-6 μ.

Em câmara úmida formam-se também por brotação conídias menores, as quais, nestas condições, são freqüentemente observadas aglomeradas em massas mucosas sôbre os acérvulos.

Rompida a cutícula, o fungo tende a difundir-se livremente sôbre a superfície do hospedeiro, permanecendo na maior parte das vêzes por baixo da parte dilatada dos pêlos estrelados.

Em seguida a êste desenvolvimento miceliano superficial, as fôlhas velhas, caídas no chão, apresentam um enegrecimento difuso do pecíolo e da parte da nervura principal que lhe é mais vizinha, enegrecimento êsse que é devido à côr escura do micélio externo acima referido e à gomificação da epiderme. O estroma assim diferenciado pode impelir para cima os pêlos estrelados; mas como a base dêstes pêlos está inserida na epiderme, o estroma pode também crescer acima e em tôrno dos próprios pêlos; e os ascomas, que se diferenciam aqui e ali, freqüentemente incluem no seu desenvolvimento os pêlos estrelados e nêles se apoiam. Os ascomas são externos, irregularmente redondos, pulvinados, medem cêrca de 100 a 180 μ de diâmetro e 40 a 60 μ de altura e apresentam um epitécio escuro bem distinto, de 5 a 20 μ de espessura, localizado nas margens, com finas cunhas estromáticas nas pregas da cutícula. Os ascos, com 25-30 × 8-12 μ, são irregularmente dispostos uns ao lado dos outros, largamente ovóides, com parede dupla bem evidente. Êles contêm 8 ascosporos munidos de 3 septos (às vêzes com vestígios de um quarto septo), constritos na altura do septo mediano, hialinos ou fuscídulos

em forma de fuso muitas vêzes ligeiramente recurvado, medindo 12-15 × 3-4 μ (Est. 2, fig. F). Os ascosporos são irregularmente justapostos no interior do asco. Em cultura, o fungo cresce lentamente e apresenta freqüentemente sectores. Sôbre ágar de batata-sacarose, as colônias, a princípio superficialmente gelatinosas ou pruinosas, apresentam-se freqüentemente, quando adultas, de côr avermelhada (de *oxblood red,* I, 1, k, a *indian purple,* XXXVIII, 67″, m), especialmente na parte inferior da cultura, ou seja no micélio submerso no meio. A côr, que se difunde lentamente no substrato é solúvel em álcool etílico. As colônias são convolutas e geralmente pulvinadas ou umbonadas, com margens onduladas ou contínuas, deprimindo ligeiramente o substrato. Elas mostram, na periferia, uma franja de usualmente 1 a 2 mm (ou mais nas culturas velhas) de micélio submerso intensamente colorido. Prolongando-se por alguns meses o desenvolvimento em cultura, o micélio aéreo cobre mais densamente as colônias, as quais, apresentam-se então como farináceas e de tonalidade rósea, em geral compreendida entre *shrimp pink* (I, 5, f) e *eosine pink* (I, 1, d). As colônias muito velhas são glabras, brilhantes, coriáceas. As colônias conservadas em geladeira depois de algum tempo formam às vêzes áreas pretas, as quais, repicadas, podem se multiplicar indefinidamente com êsse caráter. Êste fenômeno já foi assinalado em outras espécies(5). Das culturas pretas podem também se obter sectores perláceos ou alaranjados pálidos (*light salmon orange,* II, 11, d, *salmon orange,* II, 11, b).

O fungo encontrado sôbre a oliveira pertence ao gênero *Elsinoë,* do qual ainda não foram descritas espécies parasitas da tribo Oleoideae. A família das Oleáceas compreende, porém, também a tribo Jasminoidae; e no gênero *Jasminum,* mais precisamente sôbre *Jasminum sambac* Soland, foi descrita *Elsinoë jasmini* Bit. & Jenkins(5), de que pudemos examinar o tipo, depositado no herbário da Secção de Fitopatologia do Instituto Biológico, sob o número 2404. O afastamento da posição sistemática dos gêneros *Olea* e *Jasminum* na família das Oleáceas, os caracteres das lesões produzidas por *E. jasmini* no jasmineiro, a presença de picnídios nessa espécie, as diferenças de dimensões dos ascomas e dos ascos já pareciam afastar de algum modo a possibilidade de referir o fungo observado na oliveira como *E. jasmini.* A forma dos ascos, globosos em *E. jasmini* e ovóides no fungo da oliveira, assim como a forma dos ascosporos, confirmam esta opinião. Os ascosporos de *E. jasmini,* são, de fato, distintamente mais largos que os do fungo da oliveira (Cf. a fig. I,

(5) Veja-se, por exemplo: Bitancourt, A. A., & Jenkins, A. E. — 1940 — Novas espécies de "Elsinoe" e "Sphaceloma" sôbre hóspedes de importância econômica. *Arq. Inst. Biol.,* **11**: 45-48.

est. 21, do trabalho citado de BITANCOURT & JENKINS(5) e a fig. F, da est. 2 do presente trabalho), e podem apresentar também septos longitudinais que não foram vistos no fungo da oliveira, cujos ascosporos mais delgados não parecem poder comportar tais septos.

O fungo da oliveira é, pois, aqui considerado espécie nova, com a seguinte diagnose:

Elsinoë oleae n. sp.

Plagulis oculo nudo fere inconspicuis, prominulis; in fructibus, raris, aequidiametralibus, verruciformibus; in foliis, petiolo et nervo mediano paginae inferioris limitatis, initio punctiformibus, dein linearibus, rugolosis, sordide ochraceis, mm 0,1-0,5 latis, mm 0,2-2 longis, vel coalescendo longioribus. Ascomatibus superficialibus, irregulariter pulvinatis, μ 100-180 latis, μ 40-60 altis, epithecio atro, μ 5-20 crasso, donatis; ascis pluribus ovoideis, superne inspissatis, octosporis, inordinate juxtapositis, pariete duplice distincto praeditis, μ 25-30 × 10-14; sporis in ascis irregulariter fasciculatis, hyalinis vel pene fuscidulis, plerumque 3-septatis, ad septum medianum constrictis, quandoque incerte 4-septatis, fusiformibus, interdum utrinque leniter curvulis, μ 12-15 × 3-4. Acervulis epidermide vix erumpentibus, forma et magnitudine indefinitis, sed semper minimis; conidiophoris in acervulo paucis, dense confertis, septatis (saepe 3-septatis), fuscidulis, paliformibus, ad septa leniter constrictis, μ 10-15 × 3-4; conidiis rarissimis, ellipsoideis, ovoideis vel subglobosis, hyalinis aut chlorinis, μ 2-3,5 × 3-6; microconidiis in aere humido visis.

Hab. in foliis fructibusque Oleae europaeae L. (Oleaceae), in locis plurimis Siciliae orientalis (Italia).

Typus in Instituto Biológico, São Paulo, Brasile (n. 9502, n. 9593) et cotypus in Instituto Phytopathologico Universitatis Barensis (Itália).

ELSINOË OLEAE N. SP., A NEW PARASITE OF THE OLIVE-TREE (*OLEA EUROPAEA* L.)

Abstract

A careful description is given of the "Olive scab", induced by the imperfect stage (Sphaceloma oleae n. sp.) of Elsinoë oleae n. sp. The perfect stage of the fungus develops on dying leaves, on the ground.

Technical descriptions of the fungus in nature and in culture and its latin diagnose are given.

The fungus, interesting in its behaviour, is not important economically.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 2

Fig. A — Face inferior de uma fôlha de oliveira com lesões de *Elsinoë oleae* sôbre a nervura principal (× 1,5).

Fig. B — Lesões de *E. oleae* sôbre raminhos de oliveira (quase T. N.).

Fig. C — Lesões de *E. oleae* sôbre drupa de oliveira (× 10).

Fig. D — Acérvulo erumpente de *E. oleae* sôbre nervura principal de fôlha de oliveira (× 600).

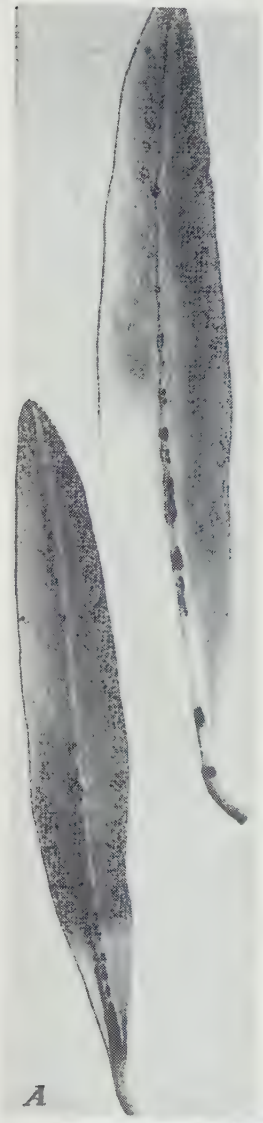
Fig. E — Secção da nervura principal de fôlha de oliveira em correspondência com uma pústula produzida por *E. oleae* (× 110).

Fig. F — Ascoma de *E. oleae* com ascos. Um ascosporo livre é visível ao lado (× 900).

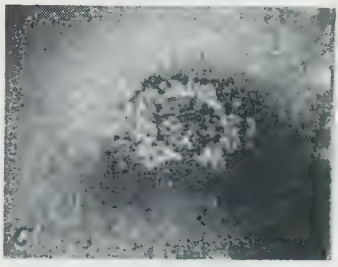
Estampa 3

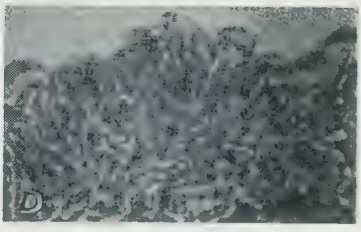
Fig. A — Ascos de *E. oleae* em diversos estados de desenvolvimento (× 1.600).

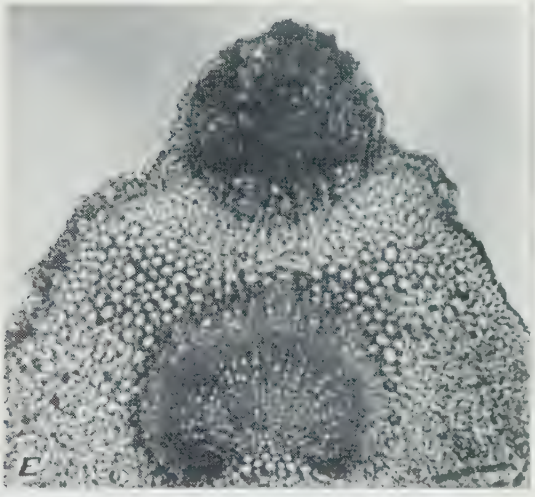
Fig. B — Pústula nova com acérvulos, de *E. oleae,* sôbre nervura principal de fôlha de oliveira (× 30).

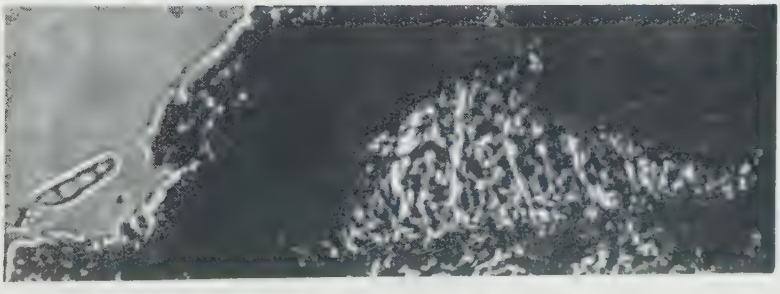

A

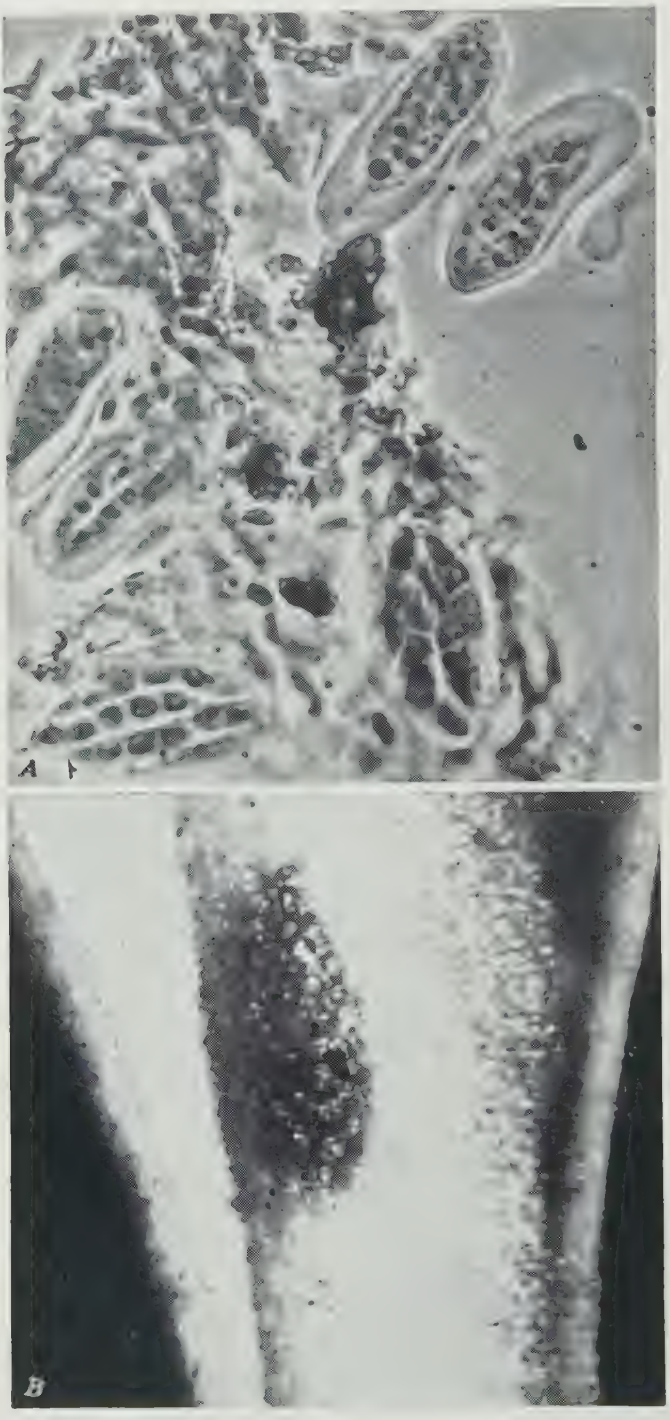
B


C


D


E


F


A
B

Vol. 26 — Artigo 4 Dezembro de 1959

EXPERIÊNCIAS SÔBRE O EFEITO DA SUB-ALIMENTAÇÃO NO DESENVOLVIMENTO DE UM ADENOCARCINOMA TRANSPLANTÁVEL DO CAMUNDONGO(*)

POR

J. R. Meyer

Do Instituto Biológico de São Paulo

Com 2 tabelas no texto

No decorrer de nossas observações sôbre os efeitos da micelina anti-neoplásica em doentes portadores de cânceres inoperáveis, tivemos ocasião de encontrar um caso de melanoma maligno com metástases generalizadas, o qual se beneficiou grandemente com o uso dêsse medicamento.

A anamnese dêsse caso revelou que a doente, no decorrer do tratamento pela micelina, continuou a fazer uso da hidrazida do ácido iso-nicotínico que vinha empregando por causa de uma lesão tuberculosa de que era portadora.

Para verificar se as melhoras acentuadas neste caso podiam ser atribuidas à associação dêsses dois medicamentos, planejamos uma série de experiências que, de um modo geral, consistiram em verificar o que acontece com o adenocarcinoma transplantável do camundongo quando os animais, inoculados com êsse câncer, recebem diàriamente uma certa quantidade de hidrazida e, seis vêzes por semana, uma injeção na cavidade peritoneal, de uma pequena dose de micelina anti-neoplásica. A seguir reproduzimos em detalhe um dos protocolos das experiências para dar idéia do que foi feito na primeira tentativa e repetido em outras quatro, tôdas tendo em vista verificar se o emprêgo da hidrazida associado à micelina podia exercer efeito desfavorável sôbre o desenvolvimento do tumor.

Experiência 1.363: Dez camundongos do mesmo sexo (fêmeas) e mesma idade (20 a 25 dias) recebem enxertos do adenocarcinoma transplantável que vimos mantendo há vários anos. Êsses enxertos ou inoculações são feitos sob a pele da região axilar esquerda, sob anestesia pelo éter. Depois das inoculações os camundongos são separados em dois lotes. Cada lote consta de 5 animais que são apanhados ao acaso entre os que foram enxertados. O primeiro lote é designado pela letra "A" e pôsto numa gaiola à parte. O segundo lote é designado pela letra "B" e é posto numa outra gaiola igual à primeira. Durante 24 horas ambos os lotes são mantidos em jejum. Depois

(*) Recebido para publicação em 27 de maio de 1959.

de 24 horas de jejum, o lote "A" passa a ser alimentado com a seguinte ração.

Torta de fubá contendo sais minerais e vitaminas	7 g
Queijo de minas, ralado	2 g
Sacarose	1 g
Hidrazida em pó	100 mg

Essas substâncias são bem misturadas e fornecidas diàriamente sob a forma de uma pasta, sem qualquer outro alimento aos cinco animais do lote.

Os animais do lote "B", destinados a servirem como testemunhas, recebem *ad libitum* sòmente a torta de fubá contendo sais minerais e vitaminas, e, duas vêzes por semana, uma pequena quantidade de aveia e cenouras cruas. Não há restrições no fornecimento de água a ambos os grupos.

Diàriamente, exceto aos domingos, o lote "A" é injetado no peritôneo com 2 dml de micelina anti-neoplásica. Os animais do lote "B" não recebem nada mais que a ração normal citada.

Nesta experiência foram registrados os seguintes fatos. Logo na primeira semana morrem dois camundongos do lote "A", possìvelmente por intoxicação conseqüente a uma ingestão maior de hidrazida, ou então em conseqüência à inanição, por se terem recusado a ingerir a ração contendo hidrazida. Tanto nos lotes de experiência quanto nos testemunhas não houve restrições de água.

Ao fim de 60 dias os resultados são os seguintes: Nos 3 camundongos tratados do lote "A" e que sobreviveram, nenhum dos inoculados deu origem a novo câncer. Nos 5 camundongos testemunhas que não foram tratados, do lote "B", desenvolveram-se 4 carcinomas grandes.

A experiência foi repetida de acôrdo com o mesmo plano diversas outras vêzes sempre com resultados concordantes, como se vê na tabela n. 1 na página seguinte.

Como se vê, os camundongos que receberam micelina anti-neoplásica mais hidrazida apresentaram um número menor de cânceres.

O material, inoculado em todos os animais, foi sempre um material ativo como provam as percentagens altas de novos cânceres em todos os grupos que serviram como testemunhas.

COMENTÁRIOS

Como vimos, a razão que nos levou a ensaiar a hidrazida associada à micelina foi o caso humano citado logo no início. Um detalhe muito importante que deve ser tomado em consideração é a

TABELA 1

Resumo dos resultados obtidos nas experiências feitas para verificar o efeito sôbre o desenvolvimento do carcinoma transplantável do camundongo pela associação da micelina anti-neoplásica com a hidrazida.

Números das experiências	N.º de camundongos		N.º de mortos antes de apresentarem tumores		N.º de cânceres desenvolvidos nos camundongos		Percentagem de cânceres desenvolvidos nos camundongos	
	Tratados	Testemunhos	Tratados	Testemunhos	Tratados	Testemunhos	Tratados	Testemunhos
1.363	5		2		0		0%	
		5		—		4		80%
1.368	5		1		0		0%	
		5		—		5		100%
1.369	5		—		1		20%	
		5		—		5		100%
1.370	5		2		1		33%	
		5		—		2		40%
1.371	5		2		1		33%	
		5		1		2		50%
Totais	25		7		3		22%	
		25		1		18		75%

quantidade exígua de alimento que foi empregada em todos os lotes de animais tratados. O motivo dessa redução foi o fato da hidrazida apresentar um sabor desagradável que leva alguns animais a recusar a ingestão do alimento contendo essa substância. Por isso é que deixamos de suprir êsses animais com qualquer alimento adicional, justamente para os forçar a ingerir a hidrazida.

Diante desta observação, a causa possível dos enxertos do carcinoma não resultarem em novos tumores, podia não ter sido a associação dos medicamentos usados, mas, a coincidência da micelina com a sub-alimentação dos animais tratados. Para verificar esta hipótese foi planejada uma nova pesquisa tendo em vista esclarecer a possibilidade da associação da micelina e da sub-alimentação serem fatores que prejudiquem o desenvolvimento do tecido canceroso inoculado. Uma primeira experiência, feita com êsse propósito, obedeceu ao seguinte plano.

Experiência 1.365: Dez camundongos do mesmo sexo e idade, como os das experiências anteriormente citadas, são inoculados da mesma maneira e separados em dois lotes de cinco comundongos, postos em duas gaiolas separadas. O primeiro, lote "A", é alimentado diàriamente com 10 g de uma ração formada por:

Torta de fubá contendo sais minerais e vitaminas	7 g
Queijo de minas, ralado	2 g
Sacarose	1 g

Essas substâncias depois de bem misturadas fornecem uma pasta que é perfeitamente aceita pelos animais desde o primeiro dia que se segue à inoculação.

Os cinco camundongos testemunhas do lote "B", recebem diàriamente *ad libitum*, a torta de fubá com sais minerais e vitaminas; e, duas vêzes por semana, pequena quantidade de aveia e cenouras cruas.

Os camundongos do lote "A", nos seis dias da semana, são injetados no peritôneo com 2 a 3 dml de micelina anti-neoplásica. Nestas experiências também não houve restrições na quantidade de água oferecida aos animais.

Como aconteceu com a experiência 1.364, alguns camundongos do lote "A", morreram 4 ou 5 dias depois de enxertados, possìvelmente por inanição não tendo podido ter acesso à ração devido à voracidade dos outros camundongos da mesma gaiola. Ao fim de sessenta dias — nos camundongos sobreviventes do lote "A" (submetidos a sub-alimentação e tratados pela micelina) foi bem menor o número de tumores. No lote "B" (testemunhas alimentados normalmente e não tratados pela micelina) os enxêrtos do tecido canceroso resultaram em tumores ou cânceres enormes e em maior número. A tabela n.º 2 dá melhor idéia dos resultados.

TABELA 2

Resumo dos resultados obtidos nas experiências feitas para verificar o efeito da micelina anti-neoplásica e sub-alimentação sôbre o desenvolvimento do carcinoma transplantável do camundongo.

Números das experiências	N.º de camundongos		N.º de mortos antes de apresentarem tumor		N.º de cânceres desenvolvidos nos sobreviventes		Percentagens de cânceres desenvolvidos nos camundongos	
	Tratados	Testemunhos	Tratados	Testemunhos	Tratados	Testemunhos	Tratados	Testemunhos
1.365	5		2		0		0%	
		5		—		4		80%
1.372	5		1		1		20%	
		5				3		60%
1.375	5				1		20%	
		5				5		100%
1.376	5		1		1		20%	
		5				4		80%
1.379	5				1		20%	
		5				4		80%
Totais	25		4		4		16%	
		25				20		80%

Como se vê, num total de 25 camundongos inoculados e alimentados com ração reduzida, e tratados com micelina, houve apenas desenvolvimento de 4 tumores, ou seja, uma média de 16% ao passo que em 25 camundongos testemunhas, alimentados com a mesma ração *ad libitum,* o número de tumores desenvolvidos foi de 20, ou seja, uma percentagem de 80%.

COMENTÁRIOS

O fato da alimentação exercer influência sôbre o desenvolvimento do carcinoma transplantável não é novo. Ottensooser (*1*) trabalhando com Caspare (*2*) no Instituto de Terapêutica Experimental de Francforte Sôbre o Meno, Seção de Oncologia, verificou que as dietas pobres em hidratos de carbono e vitaminas B_1 exerciam nítido efeito sôbre o carcinoma transplantável de Ehrlich.

Recentemente Mittmann (*3*), fazendo um estudo estatístico com dados estabelecidos pela Organização das Nações Unidas, mostrou que existe uma correlação muito estreita entre a taxa de mortalidade pelo câncer e a quantidade calórica das substâncias gordurosas de origem animal que entram na alimentação.

Igualmente Weimer e colaboradores (*4*) verificaram, entre outros fatos, que os ratos, portadores do carcinoma 256 de Walker, ficam com as glicoproteínas do sôro reduzidas quando os tumores estão bem desenvolvidos.

Pearson, citado por Woglom (*5*), experimentando com camundongos da linhagem RIII, inoculados com um carcinoma transplantável de tipo planocelular, verificou que a redução da dieta, de modo a acarretar 20 a 25% de perda de pêso, coincidia com a absorção dos enxertos em 30% dos animais ao contrário do que acontecia com os camundongos testemunhas alimentados normalmente e em que havia 100% de tumores como resultado dos enxertos.

É evidente que o crescimento das células cancerosas depende, para formação do tumor, da matéria prima existente na circulação, e que essa matéria prima depende da quantidade de alimentos ingeridos.

O fato mencionado está em relação com a antiga teoria da atrepsia estabelecida por Ehrlich. Baseado no fato de que quando um animal é portador de um tumor em franco desenvolvimento, o enxerto de um segundo tumor não cresce, Ehrlich estabeleceu a teoria segundo a qual a falta de desenvolvimento do segundo tumor é devida ao fato de quase tôda a matéria necessária ao crescimento

ser utilizado para o crescimento do primeiro. Conquanto essa teoria tenha sido muito combatida por outros pesquisadores, EHRLICH a explicava baseado em diversas observações. Quase todos os que se opuseram a essa teoria admitiam que o não crescimento do segundo enxerto decorresse da presença de anticorpos, formados com a presença do primeiro tumor. Esta hipótese, todavia, não explica o fato, comumente observado, em que se vê a absorção dos enxertos ou mesmo de grandes tumores já formados em camundongas que se tornam prenhes. No decorrer de nossas observações pudemos verificar quando há coincidência de tumores enxertados com prenhês que, quanto maior o número de embriões em desenvolvimento, tanto menor será o desenvolvimento dos enxertos tumorais ou dos tumores. Nestes casos não se pode admitir a presença de anticorpos por isso que não houve uma inoculação tumoral prévia para fornecer os antígenos. Muito mais possível como causa desse fato, é que a existência dos embriões, com a sua habilidade maior para utilizarem as substâncias nutritivas necessárias a seu crescimento, exerça uma concorrência às células tumorais que não são tão capazes como as embrionárias de se utilizarem das substâncias nutritivas existentes em circulação.

Ainda sôbre o mesmo assunto é digno de nota registrar que os hidratos de carbono parecem ter um efeito mais acentuado sôbre o crescimento, uma vez que, como é sabido, é freqüente haver uma hiperglicemia nos sêres humanos portadores de câncer, acelerando seu desenvolvimento. Outro fato que faz supor a importância dos hidratos de carbono, e especialmente da glicose, é a descoberta de WARBUG mostrando que as células cancerosas, para utilização dêste açúcar, dispõem de recursos diferentes dos das células normais, elaborando-o por meio da chamada glicolise anaeróbia.

RESUMO

O autor, depois de uma série preliminar de experiências em que foi obrigado, para ingestão da hidrazida, a empregar uma ração reduzida durante a manutenção de camundongos enxertados com um adenocarcinoma transplantável, verificou resultados que o levaram a formular a hipótese segundo a qual a deficiência do crescimento do câncer transplantado nos animais sub-alimentados era provocada pela deficiência alimentar dos animais tratados. Numa segunda série de experiências em que submeteu os camundongos enxertados com o adenocarcinoma transplantável a uma ração reduzida, sem hidrazida, verificou que os animais sub-alimentados apresentavam

uma percentagem de tumores muito menor do que a dos alimentados normalmente.

Diante dessas observações concluiu que a sub-alimentação dos animais enxertados é um fator altamente prejudicial para o crescimento do câncer transplantável, confirmando, assim, observações de outros pesquisadores.

EXPERIMENTS ON THE EFFECT OF SUB-NUTRITION ON THE DEVELOPMENT OF A TRANSPLANTABLE ADENOCARCINOMA OF THE MOUSE

Abstract

Observations on a previous series of experiments, showing unfavorable effects of an insufficient amount of food (containing isoniazid) on the growth of a transplantable adenocarcinoma of the mouse, led to a new series of experiments in which insufficient nutrition (without isoniazid) resulted in a marked decrease of development of the same transplantable mammary adenocarcinoma. Groups of five mice fed daily with 10 gm. of a diet consisting in 70% of new inoculations when there is a previous growing tumor and minerals, showed from 0 to 30% of tumors resulting from inoculations, while controls, fed ad libitum *with the same diet, showed from 80 to 100% of tumors.*

The author relates this fact with the precarious development of new inoculations when there is a previous growing tumor and with the precarious development of inoculated transplantable tumors in pregnant mice.

According to these unfavorable effects of deficient nutrition, the hypothesis of a t h r e p s i a, advanced by Ehrlich to explain the failure of development of transplanted tumor in animals having a previous tumor, is to be mantained.

BIBLIOGRAFIA

1 — Ottensooser, F. — 1933 — L'influenza della dieta sui tumori trapiantabili. Bolletino della Lega Italiana per la lotta contra el cancro — Ano VII — N.º 4.

2 — Caspare, W. — 1933 — Über die Beeinflussung der Wachstums von transplantations geschwülsten der Mäuse durch Fütterung mit dem antineuritischen Faktor des Vitamins B. — Zeitschr. fur Krebsforschung, 3: 361-368. Berlin.

3 — Mittmamn, O. — 1957 — Über cinen Zuzammenhang zwischen Krebssterblichkeit und Ernährung. *Krebsarzt*, Viena, 12: 78-85.

4 — Weimer, H. E., Quinn, F. A., Redlish-Moshin, J. & Nishihara, H. — 1957 — Effects of tumor growth on serum glycoprotein concentration, in the rat — *Jour. Nat. Cancer Inst.*, Washington, 19: 409-417.

5 — Woglom, W. H. — 1913 — Studies in Cancer. Vol. 1 — The Study of Experimental Cancer. Columbia University Press.

Aproveitamos a oportunidade para agradecer o eficiente auxílio e a excelente colaboração prestada na realização destas séries de experiências pelo nosso companheiro, o biologista Gastão Barbosa Rodrigues.

Vol. 26 — Artigo 5 Dezembro de 1959

POLVILHAMENTO DO SOLO COMO MÉTODO DE COMBATE À BROCA DO CAFÉ(*)

POR

S. Franco do Amaral, D. Puzzi e A. Orlando

Do Instituto Biológico de São Paulo

Com as estampas 4-5 e 6

O combate à broca do café, *Hypothenemus hampei* (FERR., 1867), pelo método de polvilhamento da planta com BHC (hexacloreto de benzeno) a despeito de proporcionar um contrôle altamente satisfatório, que não raras vêzes atinge às proximidades de 100%, apresenta, todavia, o inconveniente de exigir a aplicação do inseticida em planta por planta, de maneira a mais uniforme e num período relativamente limitado, sujeito a precipitações pluviométricas mais ou menos pesadas, que com certa freqüência ocasionam a lavagem das plantas, obrigando a repetição dêsse tratamento.

O polvilhamento do solo, como método de combate à broca capaz de eliminar os inconvenientes do tratamento da planta, apresentava-se como um problema digno de ser investigado, quer pela sua relação com os hábitos dessa praga, como pelas indicações de DUVAL quanto à sua praticabilidade (*2*).

De observações de longa data, sabe-se que o fator responsável pela sobrevivência da broca, nos períodos de entre safra, são os grãos de café que permanecem na lavoura. Êsses grãos e muito particularmente aquêles que ficam no solo, sob a "saia" do cafeeiro, constituem, como demonstrou BERGAMIN (*1*), o principal elo de ligação do ataque dessa praga entre duas colheitas consecutivas.

Êsses fatos, aliados à maior facilidade e rapidez que o polvilhamento do solo poderia apresentar em relação ao método de polvilhamento da planta e à menor possibilidade das chuvas arrastarem o inseticida do solo, mormente da parte situada sob a "saia" do cafeeiro, constituiam fatôres aparentemente favoráveis a êsse método, ainda não experimentado em pequenos canteiros e segundo as exigências da estatística experimental.

MÉTODO E MATERIAL

Num talhão de café da fazenda S. Vicente, situada no município de Campinas, foram instalados ao acaso, numa área retangu-

(*) Recebido para publicação em 24 de julho de 1959.

lar compreendendo 1.216 plantas, delimitada num sentido por 38 cafeeiros e 32 no outro, 30 canteiros de 16 plantas, marginados por uma bordadura composta de 2 fileiras de cafeeiros (fig. 1). Nesses canteiros foram aplicados, em 5 repetições, com o auxílio de uma polvilhadeira manual, os seguintes tratamentos: polvilhamento do solo com ALDRIN com 2,5% de princípio ativo e BHC com 2% de isômero gama, em comparação com o polvilhamento das plantas com BHC com 1% de isômero gama, que constitui o processo usual de combate à broca do café.

No polvilhamento do solo situado sob a "saia" dos cafeeiros e entre essas plantas, realizado em duas épocas diferentes, em novembro, quando os grãos de café achavam-se na sua fase inicial de desenvolvimento, na prática denominados "chumbinhos" e não sujeitos ao ataque da broca (estampa 4) e no início de dezembro, quando êsses grãos apresentavam-se mais desenvolvidos e próximos do estágio suscetível ao ataque dessa praga (estampa 5), o ALDRIN (A e AI), foi aplicado na razão de 90 kg (2.250 g de princípio ativo) e o BHC (B e BI), na quantidade de 88 kg (1.760 g de isômero gama) para a área ocupada por 1.000 cafeeiros.

O polvilhamento das plantas com BHC com 1% de isômero gama, (B2), iniciado em princípios de janeiro, quando a infestação nos frutos das bordaduras, já desenvolvidos (estampa 6), atingiu a 5%, foi aplicado, segundo a técnica recomendada (4), na razão de 84 kg do produto para os 2 polvilhamentos de 1.000 cafeeiros, (840 g de isômero gama para os 2 polvilhamentos espaçados de 20 dias e normalmente recomendados).

Com o fim de se evitar, o tanto quanto possível, a migração de brocas das TESTEMUNHAS e das bordaduras e, por conseguinte, a interferência de uma população estranha àquela inicialmente existente em cada canteiro, as plantas das bordaduras foram igualmente polvilhadas com BHC com 1% de isômero gama e de conformidade com o processo usual de combate à broca do café (B2).

Para efeito de avaliação da eficiência dos tratamentos, quando os grãos de café já haviam completado a sua maturação e se encontravam em condições de permitirem a sua colheita, foram retiradas, ao acaso, das 4 plantas centrais de cada canteiro, um certo número de frutos e dessas amostras, correspondentes aos diversos tratamentos e respectivas repetições, considerados apenas 100 frutos, nos quais foram anotados os grãos broqueados.

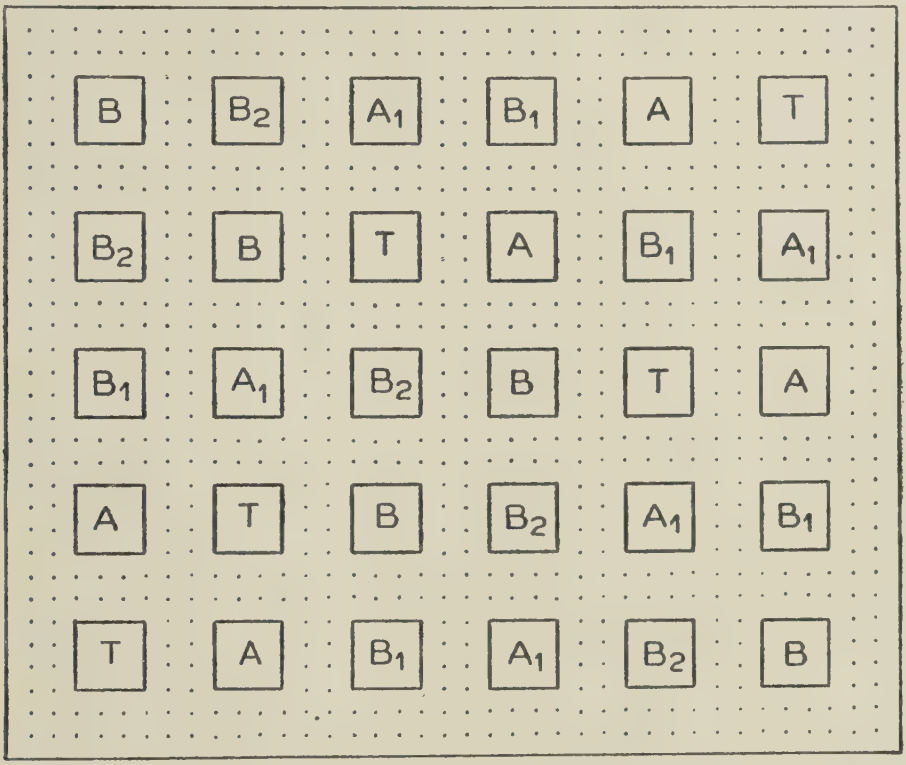


FIGURA 1-MAPA DO CAMPO EXPERIMENTAL

□ = CANTEIRO DE 16 PLANTAS

⁘ = BORDADURA DE 2 FILEIRAS DE PLANTAS

A = POLVILHAMENTO DO SOLO EM NOVEMBRO COM ALDRIN A 2,5%
A_1 = POLVILHAMENTO DO SOLO EM DEZEMBRO COM ALDRIN A 2,5%
B = POLVILHAMENTO DO SOLO EM NOVEMBRO COM BHC A 2%
B_1 = POLVILHAMENTO DO SOLO EM DEZEMBRO COM BHC A 2%
B_2 = POLVILHAMENTO DA PLANTA COM BHC A 1%
T = TESTEMUNHA, SEM TRATAMENTO

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados experimentais obtidos por essa técnica, após sua transformação em arco seno da $\sqrt{\%}$ e análise pelo método de variância, revelaram, para os tratamentos, resultado significante no nível fiducial de 5% (tab. 1). Êsses dados, assim transformados submetidos ao teste "T" (fig. 2), indicaram que o polvilhamento da planta com o BHC (B2), foi significante em relação às TESTE-

MUNHAS e aos tratamentos realizados com o ALDRIN (A e AI), sem revelar, todavia, qualquer significância em relação aos polvilhamentos do solo executados com o BHC (B e BI), que por sua vez não diferiram das TESTEMUNHAS e do ALDRIN.

TABELA 1

Análise de variância do número de frutos broqueados, transformados em arco seno da $\sqrt{\%}$

F. de variação	Soma dos Quadrados	G. L.	Variância	F
Total	4.345,7201	29	149,8524	
Tratamento ...	1.615,4341	5	323,0868	2,31(*)
Repetição	436,1722	4	109,0405	
Êrro	2.294,1138	20	114,7057	

(*) Significante no nível fiducial de 5%.

Figura 2

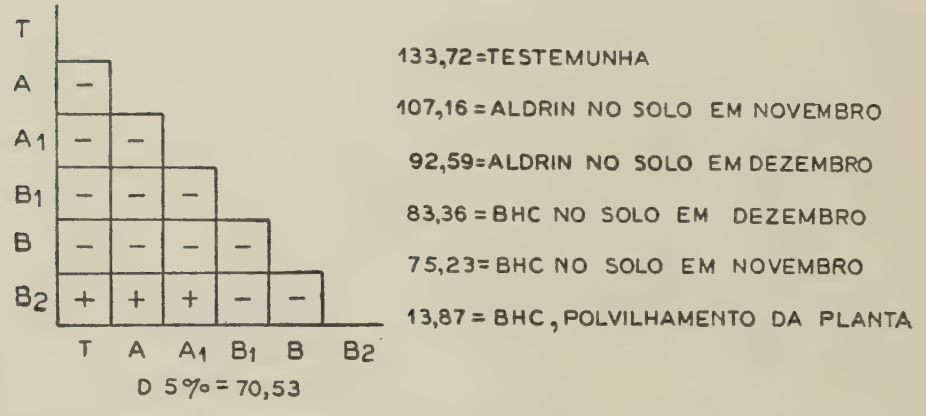


Fig. 2 — Representação gráfica da significação estatística das diferenças dos diversos tratamentos, segundo o n.º de frutos broqueados, transformados em arco seno da $\sqrt{\%}$. Êste gráfico foi construido dispondo-se os tratamentos na vertical em ordem crescente de baixo para cima e na horizontal em ordem decrescente da esquerda para a direita. O grau de significação estatística entre os tratamentos é obtido da seguinte maneira: na vertical procura-se a letra correspondente ao tratamento de menor infestação e segue-se da esquerda para a direita até encontrar-se os quadros dos demais tratamentos em comparação. O sinal (+) indica diferença significativa no nível fiducial de 5% e o sinal (—) indica ausência de diferença significativa.

Não obstante a ausência de significância entre os polvilhamentos realizados com o BHC, independentemente da sua modalidade ou época de aplicação, o polvilhamento das plantas (B2) pode ser considerado como superior ao polvilhamento do solo (B e BI), uma vez que esta modalidade não apresentou diferença significante em relação à TESTEMUNHA (T) e aos tratamentos procedidos com o ALDRIN (A e AI).

Todavia, a ausência de diferença significante entre os polvilhamentos das plantas e do solo, realizados com o BHC, que permite considerá-los como igualmente eficientes quando comparados entre si, não elimina, por ora, a possibilidade dêsse polvilhamento do solo como método de combate à broca do café.

A repetição desta experiência em lavoura mais uniforme em relação à conformação dos cafeeiros e vigor de sua "saias", constitui uma condição que deve ser levada em conta antes de um julgamento definitivo quanto à praticabilidade dêsse método, mormente se considerado que a broca do café encontra melhores condições para a sua sobrevivência e proliferação, quando abrigada nos grãos de café que permanecem na lavoura sob a "saia" dos cafeeiros e muito particularmente dos cafeeiros bem desenvolvidos que, pelo fato de evitarem a incidência dos raios solares sôbre êsses grãos, lhes possibilitam um teor de umidade que mais atende às necessidades biológicas dessa praga (*1*).

A menor incidência da broca nos canteiros tratados com o BHC (0,6% para o polvilhamento das plantas, 7% e 9% para os polvilhamentos do solo, realizados em novembro e dezembro), quando comparada com a infestação das TESTEMUNHAS (23%) e dos canteiros tratados com o ALDRIN (16% e 14% para os polvilhamentos executados, respectivamente, em novembro e dezembro) vem demonstrar que as bordaduras de 2 fileiras de cafeeiros, polvilhados com o BHC, atenderam plenamente a sua finalidade, impedindo como se pretendia, o aparecimento de população estranha àquela que se originou do foco inicialmente existente em cada um dos canteiros do campo experimental. Êsse fato, também presente nos dados apresentados por Lepage & Giannotti (3), ainda que não considerado por êsses autores, vem demonstrar que a população inicial dessa praga, existente numa dada lavoura ou suas proximidades, não exerce qualquer influência sôbre a eficiência do método usual de polvilhamento das plantas com BHC.

O repasse da colheita, como providência necessária para garantir ou aumentar a eficiência do polvilhamento das plantas com BHC com 1% de isômero gama, e que representa o processo usual de

combate à broca do café, constitui, por conseguinte, uma medida inútil, justificável sòmente como uma operação econômica e no caso do café a ser retirado da lavoura compensar a sua despesa ou possibilitar a dispensa dêsse polvilhamento.

CONCLUSÕES

O polvilhamento das plantas com o BHC, com 1% de isômero gama, realizado de conformidade com o processo usual, revelou-se superior aos polvilhamentos do solo executados com o ALDRIN e o BHC, sem contudo eliminar a praticabilidade do polvilhamento do solo com o BHC, que se comportou como um método de eficiência média.

Não obstante êsse fato e as restrições apontadas na discussão dos resultados desta investigação, o polvilhamento do solo com o BHC afigura-se, todavia, como um método promissor, especialmente se consideradas as condições das novas lavouras que se acham em formação. A sua menor distância entre as plantas, deixando menor espaço de solo sujeito à incidência direta dos raios solares, poderá proporcionar, especialmente pelos frutos que permanecem nessa parte da lavoura, um ambiente mais favorável para a sobrevivência de uma maior população de broca e dêsse modo, modificar os resultados em favor dêste método, que apresentaria, em tais lavouras, a vantagem de não implicar num maior gasto de inseticida e de mão de obra, como aconteceria, certamente, em relação ao polvilhamento das plantas.

A repetição desta experiência, especialmente em lavouras nessas condições, afigura-se, portanto, como uma condição indispensável para um julgamento definitivo da eficiência e vantagem dêsse polvilhamento.

A eficácia do polvilhamento das plantas com BHC com 1% de isômero gama, que representa o processo usual de combate à broca do café, independe da população residual dessa praga existente numa dada lavoura ou suas proximidades ou da realização prévia do repasse da colheita, que se justificaria sòmente no caso do café a ser retirado da lavoura compensar a sua despesa ou possibilitar a dispensa dêsse polvilhamento.

AGRADECIMENTOS

Os autores deixam seus agradecimentos consignados aos proprietários da fazenda S. Vicente e muito particularmente ao Dr.

Miguel Ferreira da Silva Neto pelas facilidades proporcionadas na instalação desta experiência e aos Srns. Benedito Luz Ribeiro, Técnico de Laboratório, Walter Finotto, Mário Luz Ribeiro e Antonio Peres Sanches, Inspetores Fitossanitários, pelos trabalhos de demarcação do campo experimental, tratamentos e coleta de amostras.

SOIL DUSTING AS CONTROL METHOD FOR THE COFFEE BERRY BORER

Abstract

In this paper are presented and discussed the results of preliminary experiment for the control of the coffee berry borer, Hypothenemus hampei (Ferr., *1867*).

The process of dusting the soil with BHC (2%) and ALDRIN (2,5%) was compared with that of the usual process of dusting the tree with BHC (1%).

The statistical analysis showed that the efficiency of the BHC applied to the tree (B2) was better than that of the dusting the soil with BHC (B and BI) and greater than that one made with ALDRIN (A and AI) which was not diferent of the CHECK. (fig. 2).

However, as it was pointed out in the discussion of the results, it is necessary to carry out other experiment to a definitive conclusion of the pratical possibility of the soil dusting with BHC as control method for the coffee berry borer.

BIBLIOGRAFIA

1 — Bergamin, J. — 1944 — O repasse como método de contrôle da broca do café *"Hypothenemus hampei* (Ferr., 1867)" (Col. Ipidae). *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, **15**: 197-208.

2 — Duval, G. — 1949 — Progressos no combate à broca do café com hexacloreto de benzeno. *O Biológico*, São Paulo, **15** (5): 85-102.

3 — Lepage, H. S. & O. Giannoti — 1949-50 — Atividade de alguns inseticidas modernos sôbre a broca do café — *Hypothenemus hampei* (Ferrari). *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, **19**: 299-308.

4 — Seixas, C. A. — 1948 — Êrros e falhas no combate químico à broca do café. *O Biológico*, São Paulo, **14** (10): 225-241.

Estampa 4 — Fase de desenvolvimento dos grãos de café, na prática denominados "chumbinhos" e não sujeitos ao ataque da broca, na ocasião do polvilhamento do solo realizado em novembro.

Estampa 5 — Fase de desenvolvimento dos grãos de café, próxima do estágio suscetível ao ataque da broca, na ocasião do polvilhamento do solo realizado em dezembro.

Estampa 5 — Fase de desenvolvimento dos grãos de café em princípios de janeiro, quando a infestação da broca atingiu a 5% e foi iniciado o polvilhamento das plantas.

Vol. 26 — Artigo 6 Dezembro de 1959

DESCRIÇÃO DO MACHO DE *SCUTELLONEMA BOOCKI*

(NEMATODA: TYLENCHIDAE) (*)

POR

J. C. Carvalho

Do Instituto Biológico de São Paulo

Com 1 figura no texto

A sub-família *Hoplolaiminae* reune um grupo de nematóides parasitas de plantas muito importante e dos mais abundantes nos solos cultivados. A sua sistemática tem passado nos últimos anos por alterações fundamentais e a última delas, de autoria de I. Andrássy, criou mais dois gêneros — *Scutellonema* e *Gottholdsteineria* — e reclassificou algumas espécies até então mantidas nos gêneros *Helicotylenchus* e *Rotylenchus*. Diversas espécies de *Rotylenchus* passaram para o gênero *Scutellonema* e dentre elas está *S. boocki*, sinônimo *Rotylenchus boocki*, Lordello, 1957, recentemente descrita. Já de longa data vínhamos estudando essa espécie, que é muito próxima de *S. brachyurum*, mas dela separada por caracteres já assinalados na sua descrição original. Lordello, contudo, não encontrou o macho, mas nós o encontramos (apenas 1), depois de uma procura demorada. Vamos descrevê-lo para assim completar a descrição da espécie. Excusamos de descrever a fêmea que já o foi na descrição original; apenas damos as medidas de 22 exemplares, em virtude de pequena variação em relação aos dados fornecidos por Lordello.

DESCRIÇÃO DO MACHO

Corpo cilíndrico, em forma de espiral aberta, despontando gradualmente na parte dianteira e terminando com cauda cônica e curta. O comprimento desta corresponde à largura do corpo na região anal. Os aneis cuticulares seguem o contôrno da cauda; anulação lateral interrompida pelas 3 faixas longitudinais dos campos laterais. Duas dessas faixas começam na região próxima ao estilete, seguindo até a região intestinal, onde é formada a terceira faixa e as três vão atingir quase o término da cauda. Estilete um pouco menor do que o da fêmea, mas igualmente reforçado. As glândulas esofageanas são longas e mal distintas, quando elas envolvem os intestinos. As células intestinais são ricas de material granulado, que dificulta o exame dos testículos. O poro excretor está localizado na latitude da glândula esofageana ventral, mais ou menos a 130 micra da região labial. Testículo longo, alcançando o meio do corpo. Espículos encabeçados, com gubernáculo provido de porção distal. A cauda é envolvida por bursa anulada e um tanto arredondada.

(*) Recebido para publicação em 2 de julho de 1959.

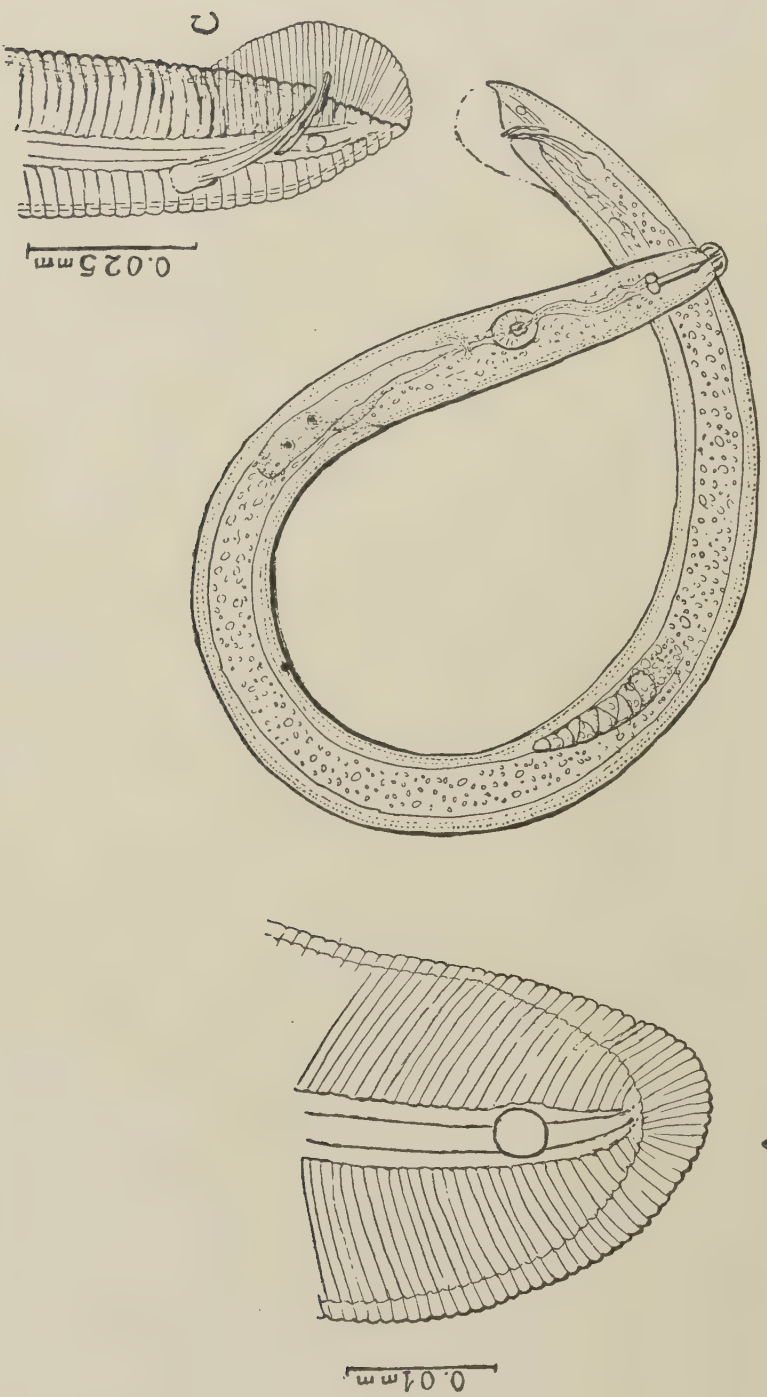


Fig. 1 — *Scutellonema boocki*. A, cauda da fêmea; B, corpo inteiro do macho; C, cauda do macho.
Fig. 1 — *Scutellonema boocki*. A, female tail; B, the male; C, male tail.

MEDIDAS. *Macho*: Compr. 0,660 mm; larg. 0,021 mm; compr. do esôfago 0,144 mm (da região labial ao extremo da glândula esofageana dorsal); distância da abertura do canal da glândula esofageana às protuberâncias do estilete 0,009 mm; cauda 0,015 mm; compr. do estilete 0,027 mm; compr. dos espículos 0,027 mm; poro excretor localizado a 0,130 mm da região labial e na latitude da glândula esofageana ventral; compr. do gubernáculo 0.012 mm; a: 31,4; b: 4,5; c: 44,0.

MEDIDAS. *Fêmea*: (22) Compr. 0,555 — 0,864 mm; larg. 0,021 — 0,038 mm; compr. do esôfago 0,122 — 0,144 mm.; a: 22,8 — 26,4; b: 4,5 — 6,0; c: 46,2 — 61,7.

RESUMO

Numerosos são os nematóides da sub-família *Hoplolaiminae* existentes nos solos cultivados; muitas espécies do gênero *Scutellonema* têm sido encontradas nos solos de São Paulo. Uma delas — *Scutellonema boocki* — foi descrita por LORDELLO, baseado sòmente nas fêmeas encontradas. Nós também vínhamos estudando essa espécie e tivemos a oportunidade de achar um espécime macho, o qual descrevemos para completar a descrição original da espécie.

SCUTELLONEMA BOOCKI — THE MALE DESCRIPTION

Abstract

This paper describes the male of Scutellonema boocki (Lordello, 1957) Andrássy, 1958.

Body cylindrical, tapering anteriorly from the region of nerve ring, posteriorly from slightly in front of anus. Tail conically obtuse, as long as anal body width. Cuticular annulation following contour of the tail. Annulation laterally interrupted by 3 longitudinal ribbons, 2 of which begin near the buccal stylet, and the third begins in front of intestine, following until near the end of the tail. It seems that at the anterior and posterior end these longitudinal ribbons are transversaly irregularly subdivided into areolae. Phasmid (Scutellum) large, located behind anus. Head well set off from neck, with 5 annules. Stylet strong 0,027 mm long, with somewhat spherical basal knobs. The oesophageal glands are quite long. Intestinal cells filled with globular reserve material. Excretory pore located at the latitude of posterior oesophageal gland, at 0,130 mm from labial region. Testis outstretched reaching to near the middle of the body. Spicula strong, arcuate. Bursa annulated and somewhat rounded.

Measurements: Female (22), length 0,555 — 0,864 mm.; a = 22,8 — 26,4; b = 4,5 — 6,0. Male: length 0,660 mm.; a = 31,4; b = 4,5; c = 44,0.

BIBLIOGRAFIA

ANDRÁSSY, I. — 1958 — *Hoplolaimus tylenchiformis* Daday, 1905 (Syn. *H. coronatus* COBB, 1923) und die Gattungen der Unterfamilie *Hoplolaiminae* FILIPJEV, 1936. *Nematologica,* **111**: 44-46.

LORDELLO, L. G. E. — 1957 — A note on nematode parasites of red Anthurium (*Anthrurium andraeanum* LIND.), with a description of *Rotylenchus boocki* n. sp. *Nematologica,* **11**: 273-276.

STEINER, G. — 1938 — Nematodes infesting red spiderlilies. *J. Agric. Res.,* 56: 1-8.

Vol. 26 — Artigo 7 Dezembro de 1959

HELICOTYLENCHUS ELISENSIS N. COMB.

(NEMATODA: TYLENCHIDAE) (*)

POR

J. C. Carvalho

Do Instituto Biológico de São Paulo

Com 1 figura no texto

O nosso trabalho — *Rotylenchus elisensis*, nova espécie associada com raízes de soja — foi publicado quase um ano depois de entregue à redação da Revista do Instituto Adolfo Lutz, por motivos alheios à nossa vontade. Aconteceu, porém, que durante êsse período, apareceu um trabalho de reclassificação dos nematóides espiralados de autoria do Dr. I. Andrássy. Por essa nova classificação, a espécie que descrevemos não pode ficar no gênero *Rotylenchus* e deve ser transferida para *Helicotylenchus*. Quando descrevemos a espécie, lembramos a precariedade do material que tínhamos em mão, cujos caracteres morfológicos eram quase invisíveis. Aproveitamos esta oportunidade para redescrever essa espécie da qual temos agora material novo em boas condições. Um dos caracteres diferenciais do gênero *Helicotylenchus* dos seus mais próximos, é a distância compreendida entre as protuberâncias do estilete e a abertura do canal da glândula esofageana dorsal, como bem acentuaram Steiner, M. Golden e Andrássy. Em o novo material pudemos precisar bem essa distância, que está bem clara no desenho da Fig. 1, A; ela tem o comprimento do estilete. Êste e outros caracteres assinalados na redescrição permitem colocar esta espécie no gênero *Helicotylenchus*.

Descrição: Corpo em forma mais ou menos espiralada, cilíndrico, despontado suavemente do bulbo do esôfago para a cabeça e, posteriormente, na parte caudal. Bulbo do esôfago volumoso, com canal proeminente. Cutícula anulada, interrompida nas três faixas dos campos laterais em todo o seu comprimento. Os campos laterais mais ou menos tão largos quanto 1/3 do diâmetro do corpo. Fasmídio localizado posterior ao anus, em forma de ponto. Cauda do macho e da fêmea virados ventralmente, com término afilado, que lembra o de *Paratylenchus macrophallus*. A cauda do macho é envolvida por bolsa muito rudimentar. Região labial contínua com o contôrno do pescoço e marcada por 4 ou 5 aneis transversais. Papilas cefálicas e anfídios não observados. Estilete bucal reforçado e com comprimento de 18 a 21 micra. Parede bucal engrossada, formando um como guia cilíndrico para o estilete. Abertura do canal da glândula esofageana dorsal localizada a uma distância da base das protuberâncias do estilete correspondente ao comprimento dêste. Junção do esôfago ao intestino quase invisível, mas vê-se

(*) Recebido para publicação em 6 de julho de 1959.

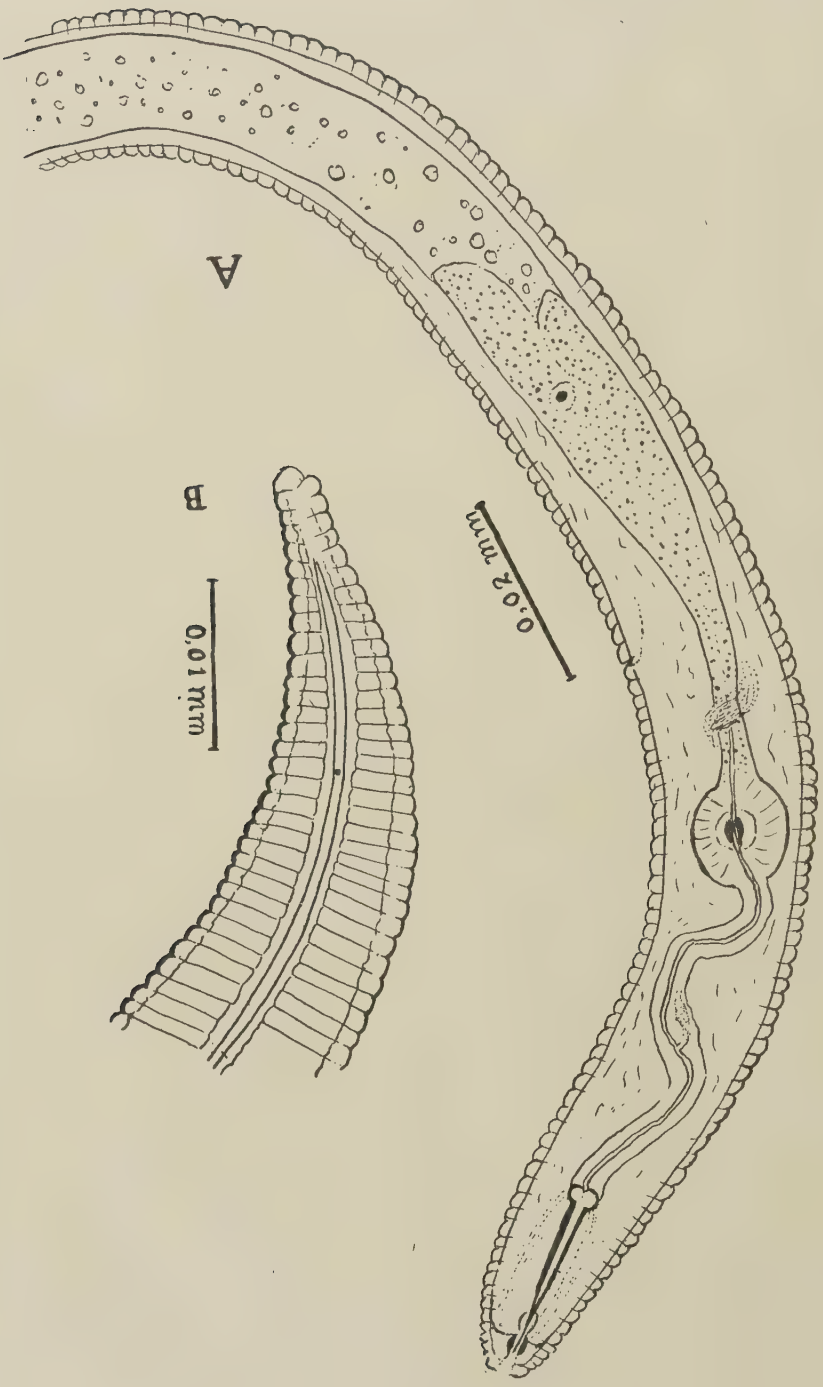


Fig. 1 — *Helicotylenchus elisensis.* A, anterior region of female; B, female tail.
Fig. 1 — *Helicotylenchus elisensis.* A, parte anterior da fêmea; B, cauda da fêmea.

o contôrno de uma das glândulas; elas não se reunem para formação de um bulbo terminal, como em *Tylenchorhynchus*. Intestinos obscuros, devido ao excesso de material granulado. Reto e anus quase invisíveis, observando-se apenas vestígios dêles.

Aparelho sexual feminino duplo, estendido, não sendo longos o dois braços do ovário. O posterior alcança quase o nível do reto. Medidas: fêmea: compr. 0,360 — 0,418 mm; a = 22,3 — 26,4; b = 3,1; c = 19; vulva 72% do corpo: macho: compr. 0,390 — 0,435 mm; a = 24,3 — 27,4; b = 4,0; c = 18,5; testículos 0,024 mm de comprimento.

HELICOTYLENCHUS ELISENSIS N. COMB.

(NEMATODA: TYLENCHIDAE)

Abstract

The paper — "Rotylenchus elisensis, nova espécie associada com raizes de soja" — was sent to press in 1957, but was not published until the end of 1958. Meanwhile a new classification of the sub-family Hoplolaiminae was published by Andrássy. According to this new classification Rotylenchus elisensis should be removed to Helicotylenchus, thus becoming H. elisensis (Carvalho, 1958) n. comb. — Synonym: Rotylenchus elisensis Carvalho, 1958.

As the original description was based on material in poor condition, a new description based now on fresh material is deemed necessary.

Description: Body forming a more or less open spiral, cylindrical, tapering slightly from the oesaphagus region to the head, and posteriorly to tail end. Lip region continuous with the neck contour and marked by four or five transverse striae. Cephalic papillae and amphids not seen. Cuticle plainly annulated, except in lateral fields; these are about 1/3 as wide as body diameter; central strip only very slightly wider than edgings ones; none of them areolated. The three strips begin at the level of the dorsal oesophageal gland outlet, ending in front of tail end. Phasmid (male and female) in the posterior region of the anus. The male and female tail ventrally arcuate with about 20 to 22 annules, the terminus like that of Paratylenchus macrophallus. The male tail is enveloped by a rudimentary bursa.

Buccal stylet of adult 0.018 to 0.021 mm long. Outlet of dorsal oesophageal gland about 0.018 mm, i.e. *one length of buccal stylet, behind the latter. Oesophageal bulb spheroid with small sclerotized valvular apparatus. Oesophageal canal very prominent.*

Junction of oesophagus with intestine obscure, but certainly the three oesophageal grands are not joined to form a basal bulb as in T y l e n c h o r h y n c h u s . Intestine opaque. Rectum and anus obscure. Branches of amphidelphic sexual apparatus of female outstretched and very short, the posterior one reaching to near the rectum. Vulva post-equatorial. Male spicula 0.024 mm long, arcuate as the tylenchoids. Testis single, as long as half length of the body.

Measurements. Female: length 0.360 — 0.418 mm; a = 22,3 — 26,4; b = 3,1; c = 19; v = 72%.

Male: 0.390-0.435 mm; a = 24,3-27,4; b = 4,0; c = 18,5.

Type location: Fazenda Santa Elisa, Campinas, Estado de São Paulo. Brasil.

Type host: Glycine max. L. (soybean).

BIBLIOGRAFIA

ANDRÁSSY, I. — 1958 — *Hoplolaimus tylenchiformis* DADAY, 1905 (Syn. *H. coronatus* COBB, 1923) und die Gattungen der Unterfamilie *Hoplolaiminae* FILIPJEV, 1936. *Nematologica,* **111**: 44-46.

CARVALHO, J. C. — 1958 — *Rotylenchus elisensis,* nova espécie associada com raízes de soja. *Rev. Inst. A. Lutz,* **17**: 43-46.

GOLDEN, A. MORGAN — 1956 — Taxonomy of the spiral nematodes (*Rotylenchus* and *Helicotylenchus*) and the developmental stages and host-parasite relationships of *R. buxophilus,* n. sp. attacking boxwood. *Bull. Md. agrc. Exp. Stat.,* A-85: 1-28.

STEINER, G. — 1945 — *Helicotylenchus,* a new genus of plant-parasitic nematodes and its relationship to *Rotylenchus* FILIPJEV. *Proc. Helminth. Soc. Wash.,* **12** (2): 34-38.

Vol. 26 — Artigo 8 Dezembro de 1959

LEPTOSPIROSE SUINA PROVOCADA PELA *L. CANICOLA*, EM SÃO PAULO(*)

V. O. Guida
M. L. Cintra
C. A. Santa Rosa
A. D. Caldas
Do Instituto Biológico de S. Paulo

M. O. Corrêa
V. Natale
Do Instituto Adolfo Lutz

Até há poucos anos, apenas o cão era considerado como o único reservatório natural de *L. canicola;* a literatura registrava sòmente alguns trabalhos sôbre a ocorrência dêsse microrganismo em outras espécies animais.

Em 1952, YAGER (*15*) referia, em uma comunicação pessoal, que 26 pessoas haviam se infectado em uma lagôa contaminada com urina de cães portadores de *L. canicola.* Disse, além disso, que 3 porcos e um leitão, de uma pocilga próxima, apresentavam títulos sorológicos positivos para a *L. canicola* e que do rim de um dêsses animais foi isolada uma amostra dessa espécie bacteriana.

A pesquisa de aglutininas no sôro sanguíneo de considerável número de porcos, em numerosos países (Alemanha (*8-9*), Suiça (*7*), Bélgica (*11*), Espanha (*4*), Congo Belga (*12*), etc.), tem sido negativa para *L. canicola.* Na Itália, BABUDIERI & FIORENTE (*1*) verificaram, em porcos, apenas aglutininas para as *Leptospira icterohemorrhagiae, L. hyos, L. australis* B, sendo negativas as provas para *L. canicola.*

Em 1955 e em 1956, HOEDEN (*10*) verificou em Israel 4 surtos de leptospirose em 4 criações de porcos, atingindo grande número de animais que, além dos sintomas típicos da moléstia, apresentavam títulos sorológicos positivos.

Aqui no Brasil, a *L. canicola* foi isolada ùnicamente de cães, por GUIDA (*5*), enquanto que CORRÊA & MEIRA (*2*) e VERONESI, CORRÊA & AMATO (*13-14*) verificaram no sangue de 4 indivíduos doentes (febre canícola), títulos sorológicos altamente significativos para a *L. canicola.* CORRÊA e cols. (*3*), em outro trabalho, encontraram, em 118 cavalos examinados, 4 sôros positivos para *L. canicola.* GUIDA, CORRÊA, SANTA ROSA & NATALE (*6*), examinando, pelo método de aglutinação-lise, o sôro de 316 bovinos, procedentes de várias regiões,

(*) Recebido para publicação em 3 de agôsto de 1959.

verificaram o seguinte resultado: 8 positivos para *L. icterohemorrhagiae,* 4 para *L. pomona* e 2 para *L. canicola.*

No presente trabalho, relatamos um surto de leptospirose, em uma criação de porcos, provocado pela *L. canicola.*

MATERIAL E MÉTODOS

A ocorrência de casos de abôrto em porcas, nos últimos meses de gestação, em uma criação de mais ou menos 1.500 animais com provas sorológicas negativas para a brucelose, nos levou a pensar em leptospirose. Além do abôrto, os animais não apresentavam outros sintomas.

Um feto abortado foi levado ao laboratório para exame. A pele foi aberta do lado esquerdo do abdome e torax. As cavidades peritoneais foram abertas com material estéril. Líquidos peritoneal, torácico e do estômago foram removidos com pipeta estéril e colocados em tubo também estéril. Pedaços de fígado e de rins foram removidos e triturados com areia e água fisiológica estéreis. Êsse material foi examinado em campo escuro.

Foram inoculadas 2 cobaias novas, com cêrca de 200 g, com 0,5 ml da emulsão do rim e fígado, por via intraperitoneal. No quinto dia após a inoculação (período de elevação térmica) as cobaias foram sangradas por punção cardíaca e o sangue semeado em meios de Verwoort e Fletcher.

Tôdas as culturas foram incubadas a 28° C e examinadas em campo escuro.

Fragmentos de órgãos foram enviados ao Dr. Paulo Bueno, para pesquisa de leptospiras, pelo método de Levaditi.

Amostras de urina foram recolhidas dos porcos, de manhã, em recipientes estéreis. Após a coleta foi verificado o pH da urina, que foi logo após inoculada em cobaias de 200 g. Foram colhidas cêrca de 30 amostras de urina, sendo 2 ml de cada uma delas inoculados por via intraperitoneal, respectivamente, em 30 cobaias.

Colhemos também 30 amostras de sangue, para inoculação em cobaias e para as provas de sôro-aglutinação. O sangue foi desfibrinado e 1 ml inoculado em cobaias jovens, por via intraperitoneal. Os sôros foram examinados pelo método de aglutinação-lise. Foram também sangrados 10 indivíduos tratadores de porcos, para pesquisa de anticorpos no sôro sanguíneo. Foram inoculadas cobaias com urina dos tratadores que apresentaram títulos positivos.

RESULTADOS

O exame direto, em campo escuro, do material retirado do feto, foi negativo. Entretanto, o exame histológico do fígado, pelo método de Levaditi, foi positivo.

As duas cobaias inoculadas com as emulsões de rim e fígado, por via intraperitoneal, apresentaram, no sexto dia, elevação de temperatura, a cêrca de 40° C. Nessa ocasião, êsses animais foram sangrados por punção cardíaca e o sangue semeado em meios da Fletcher e Verwoort. O exame diário dessas culturas mostrou a presença de *leptospira* no nono dia. A amostra, assim obtida, foi identificada como *L. canicola* pelo método de sôro-aglutinação.

Das cobaias inoculadas com urina, uma só apresentou, no quinto dia, temperatura de cêrca de 40° C; foi sangrada e o sangue semeado nos meios de Verwoort e Fletcher que, examinados diàriamente, apresentaram cultura positiva no oitavo dia. A amostra foi também identificada como *L. canicola.* As cobaias inoculadas com sangue nada apresentaram.

Dos trinta sôros sanguíneos examinados, 17 eram positivos para *L. canicola,* sendo 2 a 1:200, 11 a 1:400, 3 a 1:800 e 1 a 1:1600. Não foram observadas nêsses sôros aglutininas para *L. icterohemorrhagiae, L. hyos, L. australis* B, *L. bataviae, L. grippotyphosa, L. pomona* e *L. sejroe.*

Em dois tratadores de porcos, admitidos há um mês antes dêste surto, encontramos respectivamente os títulos de 1:400 e 1:800 para *L. canicola,* sem que referissem ocorrência anterior de sintomas característicos da febre canícola. No momento do exame estavam em condições normais de saúde. O hemograma de ambos era normal. A inoculação da urina dêsses indivíduos em cobaias foi negativa. Os exames clínicos e hematológicos foram realizados gentilmente pelo Dr. Waldemar F. de Almeida.

DISCUSSÃO

A incidência da *L. canicola* no cão, em São Paulo, é muito baixa; verificamos em uma pesquisa anterior a presença dêsse microrganismo em 5% dos cães examinados.

Com o isolamento da *Leptospira canicola* em suínos de São Paulo, o problema da leptospira assume certa gravidade não só sob o ponto de vista epizootiológico como também epidemiológico, por-

que sendo os porcos, como os ratos, grande disseminadores de leptospiras, quando portadores, o risco de infecção é muito maior. Nêsse caso, as medidas profiláticas se impõem, não só tratando os animais infectados, como também vacinando os sãos. São medidas que estamos tomando e serão objeto de um próximo trabalho.

Entre os dez tratadores desta criação, apenas 2 apresentaram títulos sorológicos positivos para leptospira. Não apresentavam, entretanto, sinais clínicos da doença e a inoculação da urina dêsses indivíduos, em cobaias, foi negativa.

RESUMO E CONCLUSÕES

Pesquisando as causas de abortos ocorridos em uma criação de porcos, no município de São Paulo, foram inoculadas, em cobaias jovens, suspensões de órgãos de um feto, expulso no período final de gestação. No quinto dia, após a inoculação, as cobaias apresentaram elevação térmica, foram sangradas nessa ocasião e o sangue semeado em meios de Verwoort e Fletcher. Após nove dias de inoculação dessas culturas a 28º C, foi possível verificar, em campo escuro, a presença de leptospiras. Usando o método de aglutinação-lise foi possível identificá-las como *L. canicola* (5). A inoculação de urina de 20 animais, no peritôneo de cobaias jovens, só em um caso foi positiva. Esta amostra também foi identificada como *L. canicola*. Dos sôros sanguíneos de trinta animais examinados dezessete apresentavam títulos acima de 1:200.

SWINE LEPTOSPIROSIS BY *L. CANICOLA*, IN SÃO PAULO

Abstract

The causes of abortion in one herd of swine were investigated.

Apparently healthy pregnant sows had aborted during the final period of the gestation. Inoculation of ground organs (kidney, liver) and stomacal contents of one foetus were made intraperitoneally in young guinea-pigs. Five days after inoculation, during the febrile period, the guinea-pigs were bled asseptically, 0.2 ml of blood being transfered to Verwoort and Fletcher media and incubated at 28º C. The dark-field examination of the cultures revealed L e p t o s p i r a after 9 days. The agglutination test proved it to be L. c a n i c o l a.

The presence of L e p t o s p i r a was demonstrated in the liver of the foetus, by the Levaditi method.

Urine of 20 pigs was also injected intraperitoneally in young guinea-pings. Only in one case it was possible to detect L. c a n i c o l a.

The results of guinea-pig inoculation of the urine of two keepers of the herd with positive serological titers were negative.

Sera of 17 out of 30 animals showed titers higher than 1:200 when examined by microscopic agglutination test.

BIBLIOGRAFIA

1 — Babudieri, R. & Fiorentíno, M. — 1954 — Leptospirosi in provincia di Parma. *R. C. Ist. super. Sanit,* **17**: 59-78.

2 — Corrêa, M. O. A. & Meira, J. A. — 1949 — Sôbre um caso de febre canícola no homem. *Rev. Med. Cirurg., S. Paulo,* **9**: 185-202.

3 — Corrêa, M. O. A., Amato Neto, V. Veronesi, R. & Fabbri, O. S. — 1956 — Leptospiroses em equinos. Inquérito sorológico. *Hospital,* Rio de Janeiro, **50**: 277-283.

4 — Covaleda, J. & Pumaroia, A. — 1954 — Agglutination de Leptospiras *L. pomona, L. mitis* y *L. icterohemorrhagiae* por los sueros de cerdos aparentemente sanos. *Rev. ibér. Parasit.,* **14**: 3-12.

5 — Guida, V. O. — 1949 — Estudos sôbre a Leptospirose canina. Pesquisas sôbre os caracteres antigênicos de uma cepa isolada de cão. *Arq. Inst. Biol.,* São Paulo, **19**: 149-152.

6 — Guida, V. O., Corrêa, M. O., Santa Rosa, C. A. & Natale, V. — 1959 — Pesquisa de aglutininas anti-leptospira no sôro de bovinos do Estado de São Paulo. *Arq. Inst. Biol.,* São Paulo, **26**.

7 — Gseli, O. — 1952 — Leptospirosen. Hans Huber. Bern. Citado em **12**.

8 — Kindler, M. & Schindler, R. — 1950 — Untersuchungen über das Vorkommen von anticorpern gegen Leptospiren bei Schweinen. *Mh. prak. Tierheilk.,* **2**: 14-19.

9 — Schlossberger, H. & Kreuz, G. — 1954 — Über Leptospiren Untersuchungen im Hygienischen Institut der Stadt und Universität Frankfort a M. Z. *Hyg. Infektkr,* **140**: 433-441.

10 — Van der Hoeden, J. — 1956 — Leptospirosis canicolaris in pigs and its probable transfer to human beings. *J. infect. Dis.,* **98** (1): 33-38.

11 — Van Riel, J. — 1952 — Recherches sur la leptospirose du porc en Belgique. *Bull. Acad. Roy. Méd. de Belgique*, **17**: 368-383.

12 — Van Riel, J. & Riel, M. — 1954 — Enquête sur l'existence de la leptospirose du porc au Congo Belge. *Bull. Soc. Pat. exot.*, **47**: 435-443.

13 — Veronesi, R., Corrêa, M. O. A. & Amato Neto, V. — 1954 — Considerações sôbre dois casos de Leptospirose no homem: febre canícola e Leptospirose grippotyphosa. Comunicado ao III Congresso Regional da Ass. Paul. Med. em 14-5-54. *Rev. paulist. Med.* **44**: 551. 1954.

14 — Veronesi, R., Amato Neto, V. & Corrêa, M. O. A. — 1954 — Considerações em tôrno de um novo caso humano de febre canícola. *Hospital*, Rio de Janeiro, **46**: 571-579.

15 — Yager, R. H. — 195 2— Symposium on the Leptospira. *Med. Sc. Public.* Washington, D. C., 221-222.

Vol. 26 — Artigo 9 Dezembro de 1959

INVESTIGAÇÕES SÔBRE PLANTAS TÓXICAS NO ESTADO DE SÃO PAULO(*)

POR

Sylvia O. Andrade e Elizabeth L. Holzhacker(**)

Do Instituto Biológico de São Paulo

Com as estampas 7 a 14

Iniciamos com êste trabalho uma série de estudos sôbre plantas suspeitas de serem tóxicas, existentes no Estado de São Paulo, centralizando a atenção principalmente nas que possam causar intoxicações aos animais, excluindo, desta maneira, as plantas ornamentais. Baseados em investigações desta natureza esperamos, com o decorrer dos tempos, conseguir um levantamento das plantas responsáveis por intoxicações em animais.

Os prejuízos causados na pecuária pela morte de animais ao ingerirem plantas tóxicas, se fôssem calculados, deveriam ser grandes no nosso Estado, justificando a necessidade de um estudo contínuo sôbre as plantas suspeitas. À dedução dêstes prejuízos poderíamos fàcilmente chegar ao consultarmos os trabalhos realizados aqui no Brasil e em outros países (*1* a *16*).

Estudando os trabalhos sistemàticamente executados na União Sul Africana, vimos que êste problema foi abordado em 1928 (*17*), quando foi discutida a questão dos prejuízos causados à pecuária pela morte de animais intoxicados por plantas e, a partir dêsse ano, foi iniciado um estudo contínuo sôbre plantas suspeitas. Analisando as pesquisas realizadas neste campo, resolvemos seguir em parte a orientação dos trabalhos realizados na União Sul Africana sôbre a seleção de plantas suspeitas, seguindo assim a trilha já traçada por elementos conhecedores da complexidade que existe neste ramo de estudos sabidamente ligados à botânica, fisiologia, farmacologia e química. Ao analisarmos de um modo geral os trabalhos lá realizados, iremos ver que, no critério de seleção do material tóxico, podem existir falhas como sejam: período vegetativo em que a planta é coletada para o estudo não seja o de toxidez maior, as doses administradas podem ser às vêzes em quantidades insuficientes; mas é verdade que êste caminho permite uma observação mais rápida e, embora nem sempre mais precisa, nos vai possibilitar a seleção de plantas.

(*) Recebido para publicação em 9 de setembro de 1959.

(**) Bolsista do Conselho Nacional de Pesquisas.

Como era de esperar, a maior parte do material experimentado neste trabalho inicial não é tóxico, o que é perfeitamente compreensível: o que seria da pecuária se tal não acontecesse? Vemos por aí quanta experiência terá que ser executada continuamente, para se poder ter conhecimento das plantas que poderiam ser responsáveis pela morte de animais nas pastagens.

O conhecimento da planta tóxica nos parece uma contribuição indispensável na investigação sôbre a causa mortis dos animais no campo. Nas pastagens, de um modo geral ,existem poucas espécies de plantas tóxicas e, quando estas ocorrem, não são abundantes, sendo que na sua maior parte elas só matam os animais se ingeridas diversas vêzes. Nestas condições, as intoxicações ficam mais limitadas aos casos em que há excesso de animais na pastagem, principalmente na época da sêca onde, pela escassez de alimentos, os animais são forçados a ingerir plantas tóxicas, em geral de mau paladar, ou no caso de pastagens mal formadas. Neste último caso, geralmente há uma rica variedade de vegetação e só com a identificação contínua das plantas suspeitas poderemos encontrar maior facilidade na identificação da espécie responsável pelos casos de intoxicações.

Dentre os prejuízos causados à pecuária por certas plantas prejudiciais não poderemos deixar de mencionar a parte relacionada ao emagrecimento, lesões da pele, abôrto, etc. Êstes vegetais, mesmo não levando necessàriamente o animal à morte, deverão ser incluidos entre as plantas nocivas (*18*). Encontramos no *Rumex crispus* L. (*30*) um exemplo dêste tipo, pois, esta planta, é nociva por causar irritação da pele, das membranas mucosas e também do aparelho digestivo de animais. Talvez possa ser aqui incluido o caso de um material enviado para esta Secção. Como veremos nos dados apresentados neste trabalho, cêrca de sete bovinos morreram em uma pastagem ao ingerirem os frutos de Camboatá, mas pelos dados experimentais obtidos, podemos supor que alguns dos sobreviventes devem ter ficado com certos órgãos lesados, emagrecendo conseqüentemente.

O material utilizado neste trabalho foi na sua maior parte coletado ao acaso, no município de Campinas e nos arredores de São Paulo.

A leguminosa *Indigofera endecaphylla,* enviada pelo saudoso Dr. Dalvo Mattos Dedecca, ex-chefe da Secção de Botânica do Instituto Agronômico de Campinas, foi a única planta das testadas neste trabalho que, inicialmente investigada sob o ponto de vista de bôa forrageira (*19*), mostrou posteriormente efeitos tóxicos (*20*).

A classificação botânica das plantas foi feita na sua maior parte pelo Dr. Oswaldo Handro, chefe da Secção de Fitoteca do Instituto de Botânica de São Paulo.

PARTE EXPERIMENTAL

A maioria das provas de toxidez foram realizadas em cobaias e coelhos. Algumas plantas foram testadas em pintos, galinhas e bovinos.

Os extratos das plantas foram obtidos pela trituração da amostra em gral ou em liquidificador com adição de solução fisiológica (NaCl-0,9%) ou de água. O macerado foi colocado em seguida em saquinhos de gaze e comprimido em prensa hidráulica (Carver Lab. Press. N. Y.) a 700 atmosferas.

O volume do extrato foi prèviamente calculado para permitir a administração intraperitonial das doses maiores no volume máximo de 5 ml para cobaias. Em geral, as extrações feitas foram de ordem de 1 parte da planta para 1 volume de água destilada ou fisiológica.

Na administração, empregamos primeiro a injeção intraperitonial dos extratos salinos das plantas, nas doses em geral de 5 gramas, 3 gramas e doses menores de acôrdo com a toxidez do material. Baseado nestes resultados iniciais, foi feita a administração do extrato aquoso da planta por sonda gástrica em cobaias e coelhos, quando houve quantidade disponível de material. Após a verificação de toxidez por via intraperitonial, de início, procuramos administrar aos animais a planta como forragem, triturada ou misturada com outros alimentos. Em muitos casos êste método falhou, os animais de laboratório estando acostumados a determinados alimentos recusam em geral a comer plantas desconhecidas, talvez pelo seu sabor. Como a administração do extrato da planta por meio de sonda gástrica nos fornece informação mais segura, êste processo foi empregado na maioria dos casos.

A conclusão "positiva" referente à toxidez de plantas altamente nocivas é relativamente fácil, e estas são as de importância para a pecuária. O mesmo não acontece em casos em que a toxidez não é muito alta. Nêste grupo estão as plantas que são tóxicas quando administradas por via intraperitonial e inócuas por via gástrica. Encarando o problema do ponto de vista da pecuária, consideramos estas plantas "negativas", embora possa existir a possibilidade de serem algumas nocivas se ingeridas continuamente e em quantidades relativamente grandes, devido a uma distribuição geográfica excepcional da mesma.

AMARANTÁCEAS

Alternanthera brasiliana (L) O. KTZE.

Nome comum — ...

Origem — Município de Campinas.

Material em bôas condições.

Cobaia 1 — Recebeu (3-5-58) por via intraperitonial o extrato de 5 g de flôres e fôlhas às 10,30 horas. Amanheceu morta.

Cobaia 2 — Recebeu por via intraperitonial o extrato de 5 g da planta (2,5 g de fôlha e 2,5 g de flor) às 14,40 horas. Após a administração a cobaia estava caída, dando gritos, apresentava forte taquicardia e tremores. Morreu após 6 horas e 20 min.

Experiências realizadas com plantas coletadas nos meses de outubro e novembro de 1958.

Cobaia 3 — Recebeu, por via intraperitonial, 2,5 g do extrato de flôres. Amanheceu morta.

Cobaia 4 — Recebeu, por via intraperitonial, 1 g do extrato de flôres. Amanheceu morta.

Cobaia 5 — Recebeu, por via intraperitonial, 2,5 g do extrato de fôlhas. Morreu ao fim de 5,50 horas.

Cobaia 6 — Recebeu, por via intraperitonial, 1 g do extrato de fôlhas. Morreu ao fim de 5,50 horas.
Necropsia: Forte hiperemia de todos os órgãos abdominais.

Cobaia 7 — Recebeu, por via intraperitonial, 500 mg do extrato de flôres. Normal dois dias após a administração.

Cobaia 8 — Recebeu, por via intraperitonial, 250 mg do extrato de flôres. Normal.

Cobaia 9 — Recebeu, por via intraperitonial, 500 mg do extrato de fôlhas. Normal.

Cobaia 10 — Recebeu, por via intraperitonial, 250 mg do extrato de fôlhas. Normal.

Cobaia 11 — Recebeu, por via oral, 40 g do extrato 100% de fôlhas. Normal dois dias após a administração.

Cobaia 12 — Recebeu, por via oral, 33 g do extrato 100% de flôres. Normal dois dias após a administração.

Coelho 1 — (2,590 kg) Recebeu, no espaço de 29 dias (13/10 a 11/11), aproximadamente 3,9 kg de *Alternanthera* como alimento verde e farelo. Pêso do animal (17/11): 1,830 kg. Normal.

Coelho 2 — (2,350 kg) Recebeu, por via gástrica, 4 doses. Total 141 g do extrato de flôres, no espaço de uma semana. Normal.

Coelho 3 — (2,420 kg) Recebeu, por via gástrica, 154 g do extrato 100% de fôlhas e flôres. Normal após uma semana do início da administração.

Coelho 4 — (2,700 kg) Recebeu, por via gástrica, 11 doses, 515 g, do extrato de fôlhas no espaço de 20 dias. Normal após passar um mês da administração da 1.ª dose.

Resultado — Negativo.

ASCLEPIADÁCEAS

Oxypetalum appendiculatum Mart. & Zucc.

Nome comum — ...

Origem — Arredores de São Paulo.

Material em boas condições.

Experiências realizadas com plantas coletadas em setembro de 1958.

Cobaia 1 — Recebeu, por via intraperitonial, o extrato de 3 g da planta. Amanheceu morta.

Cobaia 2 — Recebeu, por via intraperitonial, o extrato de 1,5 g de fôlhas. Normal.

Cobaia 3 — Recebeu, por via intraperitonial, o extrato de 5 g de frutos. Amanheceu morta.

Cobaia 4 — Recebeu, por via intraperitonial, o extrato de 3 g de frutos. Morreu ao fim de 23 horas após a injeção.

Cobaia 5 — Recebeu, por via intraperitonial, o extrato de 1,5 g de frutos. Normal.

Resultado — Negativo?

Nota: A administração de extratos por via gástrica não pôde ser feita por falta de planta.

BASELIÁCEAS

Boussingaultia gracilis MIERS VAR. *pseudo baseloides* HAUM

Nome comum — ...

Origem — Município de Campinas.

Material verde em boas condições.

Cobaia 1 — (380 g) (20/2/58) Recebeu, por via intraperitonial, o extrato de 5 g da planta (fôlhas e caule). Encontrada morta no dia seguinte.

Cobaia 2 — Recebeu, por via intraperitonial, o extrato de 3,2 g da planta. Morreu no dia seguinte.

Cobaia 3 — (390 g) (20/2/58) Recebeu, por via intraperitonial, o extrato de 3 g da planta. Amanheceu morta.

Cobaia 4 — (385 g) Recebeu, por via intraperitonial, o extrato de 1,5 g da planta. 4 horas após apresentava sintomas graves, pêlos arrepiados, desequilíbrio, morreu à noite.
Necropsia — hemorragia generalizada nos órgãos abdominais.

Cobaia 5 — (8/4/58) Recebeu, por via intraperitonial, material extraído com éter correspondente a 2 g da planta. Morreu durante a noite.

Sintomas apresentados pelas cobaias após a administração por via intraperitonial do extrato da planta: dificuldade respiratória, desequilíbrio, paralisia dos membros posteriores e aumento de volume do abdomen. Necropsia: hemorragia generalizada dos órgãos abdominais, sempre mais intensa nas supra-renais; grande quantidade de gases intestinais.

Coelho 1 — (2,550 kg) Recebeu, por via gástrica, 10 doses do extrato de 60 g da planta, no espaço de 10 dias; total recebido 600 g 15 dias após ter recebido a última dose estava com aspecto normal.

Coelho 2 — Recebeu, por via gástrica, 9 doses do extrato da planta; total 540 g. Um mês após ter recebido a última dose estava com aspecto normal.

O poder tóxico é destruído pela secagem da planta à temperatura de 60° C.; a secagem à sombra não altera a sua toxidez. O princípio tóxico é solúvel em éter (50° C), em álcool etílico a 75%, insolúvel em clorofórmio; em solução álcoolica, é destruido pelo aquecimento a 100° C por 3 minutos. Baseado no resultado da administração por via oral, esta planta não é tóxica.

Resultado — Negativo.

CAPARIDÁCEAS

Cleome spinosa JACQ.

Nome comum — Mussambé-de-espinho, Sete Marias.

Origem — Arredores de São Paulo.

Material em boas condições.

Experiências realizadas com plantas coletadas em setembro de 1958.

Cobaia 1 — Recebeu, por via intraperitonial, o extrato de 4,5 g da planta. Normal.

Cobaia 2 — Recebeu, por via intraperitonial, 5,4 ml do extrato de 3 g da planta. Normal dois dias após a administração.

Resultado — Negativo.

COMPOSTAS

Ageratum conyzoides L.

Nome comum — Erva de São João.

Origem — Município de Campinas.

Material em boas condições.

Cobaia 1 — (5/2/58) Recebeu, por via intraperitonial, 2 ml do extrato de 2 g da planta. Normal.

Cobaia 2 — Recebeu, por via gástrica, nos dias 28 e 29, respectivamente, 15 ml do extrato de 20 g da planta. Normal.

Resultado — Negativo.

Blainvillea biaristata DC.

Nome comum — ...

Origem — Arredores de São Paulo.

Material em boas condições.

Experiências realizadas com plantas coletadas em setembro de 1958.

Cobaia 1 — Recebeu, por via intraperitonial, o extrato de 5 g da planta. Amanheceu morta.

Cobaia 2 — Recebeu, por via intraperitonial, o extrato de 1,5 g da planta. Amanheceu morta.

Cobaia 3 — Recebeu, por via intraperitonial, o extrato de 750 mg da planta. Normal.

Resultado — Negativo?

Nota: A administração de extrato por via gástrica não foi feita por falta de planta.

Eclipta alba (L.) Hassk

Nome comum — ...

Origem — Município de Campinas.

Material em boas condições.

Experiências realizadas com plantas coletadas em maio de 1958.

Cobaia 1 — Recebeu, por via intraperitonial, 5 ml do extrato de 5 g da planta. Amanheceu morta.

Cobaia 2 — Recebeu, por via intraperitonial, 3,5 ml do extrato de 1,5 g da planta. Amanheceu morta.

Cobaia 3 — Recebeu, por via intraperitonial, 1 ml do extrato de 800 mg. da planta. Normal.

Material recebido em 9/3/59, Granja São Miguel — Itapeva.

Cobaia 4 — (250 g) Recebeu, por via intraperitonial, o extrato de 5 g da planta. Normal.

Cobaia 5 — (220 g) Recebeu, por via intraperitonial, o extrato de 3 g da planta. Amanheceu morta.

Cobaia 6 — (230 g) Recebeu, por via intraperitonial, o extrato de 1 g da planta. Normal.

Resultado — Negativo.

Elvira biflora

Estampa 7

Nome comum — ...

Origem — Município de Campinas.

Material em boas condições.

Experiências realizadas com material coletado em maio de 1958.

Cobaia 1 — Recebeu, por via intraperitonial, 5 g do extrato da planta. Morreu 1 hora e 20 min. após a administração.

Cobaia 2 — Recebeu, por via intraperitonial, 1,5 g do extrato da planta. Morreu 1 hora e 25 min. após a administração.

Cobaia 3 — (295 g) Recebeu, por via intraperitonial, 800 mg do extrato da planta. Morreu 1 hora e 10 min. após a administração.

Cobaia 4 — (430 g) Recebeu, por via intraperitonial, 100 mg do extrato da planta. Morreu ao fim de 14 horas e 20 min.

Cobaia 5 — (780 g) Recebeu, por via gástrica, o extrato de 25 g da planta. Amanheceu morta.

6 cobaias que receberam o extrato da planta, por via gástrica, apresentaram duas fases distintas que precedem a morte. A primeira fase é de excitação, com o ritmo respiratório grandemente aumentado (taquipnéia); algumas cobaias apresentam, neste período, emissão involuntária de fezes, urina e gases (relaxamento dos esfíncteres). Sobrevem, em um segundo período, a fase de depressão, em que se nota uma grande prostração, paraplegia dos membros posteriores, apnéia culminando com a morte.

Necropsia: hemorragias puntiformes no pulmão ou, em outros casos, hiperemia; pontos hemorrágicos na cavidade gástrica e, geralmente, também no duodeno; presença de gás em tôda a porção intestinal.

Resultado — Positivo.

Nota: Estudos realizados sôbre o princípio tóxico da *Elvira biflora*, estão em vias de publicação.

Erigeron bonariensis L.

Nome comum — ...
Origem — Município de Campinas.
Material em boas condições.

Experiências realizadas com plantas coletadas em janeiro de 1958.

Cobaia 1 — Recebeu, por via intraperitonial, o extrato de 6,6 g da planta. Normal.

Cobaia 2 — Recebeu, por via intraperitonial, 2 ml do extrato de 2,2 g da planta. Morreu durante a noite.

Cabaia 3 — Recebeu, por via gástrica, nos dias 28 e 29 respectivamente 13,3 g e 15 g da planta. No dia seguinte recebeu, por via intraperitonial, o extrato de 1,3 g da planta. Normal.

Resultado — Negativo.

Mikania cordifolia (L. f.) WILLD

Nome comum — Erva cobre.
Origem — Município de Campinas.
Material em boas condições.

Experiências realizadas com plantas coletadas em maio de 1958.

Cobaia 1 — Recebeu, por via intraperitonial, o extrato de 5 g da planta. Morreu ao fim de 20 horas.

Cobaia 2 — Recebeu, por via intraperitonial, 4 ml do extrato de 3 g da planta. Amanheceu morta.

Cobaia 3 — Recebeu, por via intraperitonial, 1,5 ml do extrato de 800 mg da planta. Normal dois dias após a administração.

Resultado — Negativo.

Perezia cubataensis LESS

Nome comum — ...
Origem — Arredores de São Paulo.
Material em boas condições.

Experiências realizadas com plantas coletadas em setembro de 1958.

Cobaia 1 — Recebeu, por via intraperitonial, o extrato de 5 g da planta. Amanheceu morta.

Cobaia 2 — Recebeu, por via intraperitonial, o extrato de 3 g da planta. Amanheceu morta.

Cobaia 3 — Recebeu, por via intraperitonial, o extrato de 700 mg da planta. Normal.

Resultado — Negativo?

Nota: A administração de extratos por via gástrica não foi feita por falta de planta.

Pterocaulon alopecuroides (Sw.) DC.

Nome comum — ...
Origem — Município de Campinas.
Material em boas condições.

Cobaia 1 — Recebeu, por via intraperitonial (29/1/58), 15 ml do extrato de 20 g da planta. Dia 30/1/58 recebeu, por via intraperitonial, 2 ml do extrato de 2,6 g da planta. Normal.

Resultado — Negativo.

EUFORBIÁCEAS

Euphorbia peplus L.

Estampa 8

Nome comum — ...
Origem — Terrenos do Instituto Biológico.
Material em boas condições.

Experiências realizadas com plantas coletadas nos meses de setembro e outubro de 1958.

Cobaia 1 — Recebeu, por via intraperitonial, o extrato de 5 g da planta. Morreu ao fim de 45 minutos.

Cobaia 2 — Recebeu, por via intraperitonial, o extrato de 1 g da planta. Normal.

Cobaia 3 — Recebeu, por via intraperitonial, o extrato de 600 mg da planta. Morreu durante a noite.

Cobaia 4 — Recebeu, por via gástrica, o extrato de 24 g da planta. Normal.

Coelho 1 — (2,560 kg) Recebeu, por via gástrica, pelo espaço de 23 dias, 10 doses do extrato de 50 g e 3 doses do extrato de 40 g da planta. Total 620 g. Animal com aspecto normal.

Experiências realizadas com plantas coletadas em junho de 1959.

Cobaia 5 — (490 g) Recebeu, por via gástrica, duas doses consecutivas do extrato de 10 g da planta. Morreu três dias após o início da administração.
Necropsia: intestino hiperemiado, grande retenção de urina e bilis, pontos hemorrágicos no estômago.

Cobaia 6 — (276 g) Recebeu, por via gástrica, do dia 17/6 a 25/6, sete doses do extrato de 10 g da planta; total 70 g. Morreu dia 26/6. *Sintomas*: algumas horas antes de morrer a cobaia apresentou diminuição acentuada de tonus muscular, permanecendo deitada sem movimentos, e com bradipnéia progressivamente crescente até a morte. *Necropsia*: grande retenção de urina e de bilis, intestino hiperemiado e pontos hemorrágicos no estômago.

Resultado — Positivo.

Euphorbia pilulifera L.

Nome comum — Erva andorinha.
Origem — Município de Campinas.
Material em boas condições.

Cobaia 1 — Recebeu, por via gástrica, nos dias 28 e 29/1/58, respectivamente, o extrato de 12,5 g e 20 g da planta. Dia 30/1/58 recebeu, por via intraperitonial, 2 ml do extrato de 1,33 g da planta. Normal.

Resultado — Negativo.

LABIACEAS

Hyptis umbrosa SALZM

Nome comum — ...

Origem — Arredores de São Paulo.

Material em boas condições.

Experiências realizadas com plantas coletadas no mês de setembro de 1958.

Cobaia 1 — Recebeu, por via intraperitonial, o extrato de 5 g da planta. Amanheceu morta.

Cobaia 2 — Recebeu, por via intraperitonial, o extrato de 3 g da planta. Amanheceu morta.

Cobaia 3 — Recebeu, por via intraperitonial, o extrato de 1,5 g da planta. Normal.

Resultado — Negativo?

Nota: A administração de extratos por via gástrica não foi feita por falta de planta.

LEGUMINOSAS

Bauhinia forficata LINK

Nome comum — Unha de vaca.

Origem — Município de Campinas.

Material em bôas condições.

Experiências realizadas com plantas coletadas em março de 1958.

Cobaia 1 — Recebeu, por via intraperitonial o extrato de 5 g de fôlhas. Amanheceu morta.

Cobaia 2 — Recebeu, por via intraperitonial o extrato de 5 g de frutos. Morreu ao fim de 14,30 horas.

Cobaia 3 — (450 g) Recebeu, por via intraperitonial o extrato de 3 g de frutos. Normal.

Experiências realizadas com plantas coletadas no mês de outubro de 1958.

Cobaia 4 — (360 g) Recebeu, por via intraperitonial o extrato de 3 g da planta. Morreu ao fim de 18 horas.

Cobaia 5 — (360 g) Recebeu, por via intraperitonial o extrato de 2,5 g de fôlhas. Amanheceu morta.

Cobaias 6 — (310 g), 7 (325 g) e *8* (370 g) — Receberam, por via intraperitonial o extrato de 1 g de fôlhas. Morreram ao fim de 17 horas.

Cobaia 9 — (320 g) Recebeu, por via intraperitonial o extrato de 500 mg de fôlhas. Morreu após 2 dias.

Nas necropsias em geral as cobaias apresentaram: forte hiperemia com hemorragias dos órgãos abdominais, inclusive estômago e intestinos.

Coelho 1 — (2,100 kg) Recebeu, por via gástrica o extrato de 39 g de fôlhas. Normal.

Coelho 2 — (2,260 kg) Recebeu, por via gástrica 4 doses consecutivas do extrato de fôlhas e flôres, total recebido 144 g. Pêso após decorrer 12 dias da primeira administração: 2,240 kg. Coelho normal.

Resultado — Negativo.

Indigofera endecaphylla Jacq.

Estampa 9

Nome comum — ...

Origem — Instituto Agronômico de Campinas.

Esta planta foi considerada no Hawaii como uma promissora leguminosa para pastagens, por se desenvolver bem junto a capins, ter recuperação rápida após o corte e ser bem aceita pelo gado. Estudos realizados na Estação Experimental de Agricultura daquêle país revelaram entretanto que a *Indigofera endecaphylla* Jacq. contêm um constituinte que é tóxico. Baseado nesses estudos (*19* e *20*), o principal efeito tóxico desta leguminosa é provocar o abôrto. As experiências por nós apresentadas nêste trabalho reproduzem as observações feitas naquela Estação Experimental.

Cobaia 1 — (29/1/59) Recebeu, por via intraperitonial o extrato de 5 g da planta. Normal.

Cobaia 2 — (20/1/59) Recebeu, por via intraperitonial o extrato de 3 g da planta. Normal.

Cobaia 3 — (29/1/59) Recebeu, por via intraperitonial o extrato de 1,5 g da planta. Normal.

Coelha 1 — Acasalada em (13/11/58). A partir de 19/11 ingeriu, pelo espaço de 17 dias, 120 g diárias de *Indigofera endecaphylla*, como alimento verde. A experiência foi interrompida, o animal não apresentava sintomas de prenhez.

Coelha 2 — Acasalada em (19/11/58). A partir do dia 20/11 ingeriu, pelo espaço de 4 dias, 120 g diárias da leguminosa. No quinto dia pela manhã o animal apresentava-se indiferente ao alimento, morreu na tarde dêste dia. *Necropsia*: pontos hemorrágicos nos órgãos abdominais.

Coelha 3 — Acasalada em (12/1/59). A partir de 26/1, foi administrado diàriamente a leguminosa como alimento verde. Nos cinco primeiros dias o animal alimentou-se bem, ingerindo aproximadamente 130 g da planta, por dia; apresentou-se a seguir indiferente ao alimento. Morreu em 3/2. *Necropsia*: fígado amarelo com atrofia, friável, gastrite com destruição da mucosa do estômago, enterite hemorrágica na porção superior. O animal continha 5 fetos muito mal desenvolvidos.

Coelha 4 — Acasalada em (16/1/59). Esta é a coelha n.º 1 desta série de experiências. A partir de 3/2 ingeriu, pelo espaço de oito dias, aproximadamente 152 g diárias de *Indigofera*. Êste animal começou a mostrar-se indiferente ao alimento, passando a ingerir ao redor de 54 g de planta por dia. Em 12/2, a coelha expeliu 2 fetos e, no dia seguinte, mais 4 fetos. O pêso variou entre 2,7 a 9,25 g e o tamanho entre 4,7 e 6,4 cm. Nesta data foi suspensa a administração da planta. Em 3/3 o animal apresentava aspecto normal.

Coelha 5 — Acasalada em (19/1/59). A partir de 5/2 a 11/2 o animal ingeriu diàriamente 150 g da planta. Pràticamente nada comeu dessa leguminosa nos cinco dias que se seguiram. Em 16/2 abortou 5 fetos de pêso variando entre 2,150 a 2,600 g, e tamanho de cêrca de 4,7 cm. A administração da leguminosa foi suspensa logo após o abôrto. O animal foi encontrado morto em 27/2.

Resultado — Positivo.

Estudos recentes sôbre a toxidez da *Indigofera endocaphylla* (*21*) revelaram que coelhos alimentados diàriamente com a leguminosa morreram ao fim de 50 a 90 dias, apresentando graves lesões no fígado.

Stylosanthes guyanensis Sw. var. *subviscosa* Benth.

Nome comum — Botão de ouro.

Origem — Município de Campinas.

Material em bôas condições.

Cobaia 1 — (21/3/58) Recebeu, por via intraperitonial, 2,8 ml do extrato de 5 g da planta. Normal.

Cobaia 2 — (500 g) (22/10/58) Rcebeu por via intraperitonial, 2,5 ml do extrato de 3 g da planta (material sêco). Normal.

Cobaia 3 — (460 g) (22/10/58) Recebeu, por via intraperitonial, 2,5 cc do extrato de 3 g da planta (material sêco). Normal.

Resultado — Negativo.

Rhynchosia minima (L.) DC.

Nome comum — ...
Origem — Município de Campinas.
Material em bôas condições.

Experiências realizadas com plantas coletadas no mês de maio de 1958.

Cobaia 1 — Recebeu, por via intraperitonial, 3 ml do extrato de 3 g de sementes. Normal.

Cobaia 2 — Recebeu, por via intraperitonial, 3 ml de extrato de 5 g de sementes. Aparentemente normal 3 dias após a administração.

Cobaia 3 — Recebeu, por via intraperitonial, 5 ml do extrato de 5 g de fôlhas. Morreu 3 dias após a administração.

Resultado — Negativo.

Teramus uncinatus Sw.

Nome comum — Amendoim veado.
Origem — Instituto Agronômico de Campinas.
Material em bôas condições.

Segundo informações obtidas, esta planta vem preocupando os criadores em geral, que lhe atribuem efeitos nocivos para o gado, e para aves; porém, pelos resultados experimentais apresentados, ela não é tóxica.

Cobaia 1 — (10/2/58) Recebeu, por via intraperitonial, 2 ml do extrato de 4 g de fôlhas. Normal.

Cobaia 2 — (2/5/58) Recebeu, por via intraperitonial, 2 ml do extrato de 2,6 g de fôlhas. No dia imediato recebeu por via intraperitonial a mesma dose. Logo após a administração o animal apresentou sintomas graves. Amanheceu morta.

Cobaia 3 — (10/2/58) Recebeu, por via gástrica, 12 ml do extrato de 24 g de fôlhas. Normal.

Coelho 1 — (1,760 kg) Recebeu, por via gástrica a partir de (17/3/58), durante 18 dias, o extrato de fôlhas. Total de 363 g. O animal aumentou 300 g de pêso.

Cobaia 4 — (22/4/58) Recebeu, por via intraperitonial, 2 ml do extrato de 3 g de sementes. Nos dias 23, 24 e 25/4 recebeu por via gástrica o extrato de 3,6 e 6 g de sementes. Normal.

Coelho 2 — (2,400 kg) Comeu durante 22 dias (de 24/9 até 18/10/58) 5 g diárias de sementes (total 110 g). Pêso no final: 2,080 kg. Normal.

Coelho 3 — (2,500 kg) Comeu durante 22 dias (de 24/9 até 18/10/58) 5 g diárias de sementes (total 110 g). Normal.

Pintos — 3 pintos de 4 dias receberam por via gástrica 0,5 ml do extrato (concentrado) de 410 mg de sementes. Normais.

Resultado — Negativo.

LILIÁCEAS

Nothoscordum sp.

Nome comum — ...
Origem — Arredores de São Paulo.
Material em bôas condições.

Experiências realizadas com plantas coletadas no mês de outubro de 1958.

Cobaia 1 — Recebeu, por via intraperitonial, 5 ml do extrato de 5 g de fôlhas, caule e flôres. Normal.

Cobaia 2 — Recebeu, por via intraperitonial, 5 ml do extrato de 5 g de bulbo. Amanheceu morta.

Cobaia 3 — Recebeu, por via intraperitonial, 3 ml do extrato de 3 g de bulbo. Aparentemente normal.

Cobaia 4 — Recebeu, por via intraperitonial, 1 ml do extrato de 1 g de bulbo. Aparentemente normal.

Resultado — Negativo.

MELIÁCEAS

Guarea trichilioides L.

Estampas 10, 11 e 12

Nome comum — Camboatá, cangerana.
Origem — Fazenda Piraí, município de Santa Rita do Passa Quatro.
Material em bôas condições.

Dados transmitidos pelo proprietário da fazenda, em setembro de 1958: "Em princípios deste mês perdemos 7 vacas num espaço de 3 dias, num sábado morreram duas, no domingo três e na segunda-

feira mais dois animais. Constatamos pela necropsia que todos os animais estavam com o rumen cheio de umas frutas pequenas. No pasto onde estiveram as vacas de curral, cresce uma árvore, nesta época coberta de frutos idênticos aos que os animais comeram e que estão ao alcance dêles. Suspeitamos que essas frutas fôssem tóxicas, apesar de, na véspera de ocorrer as mortes, os animais terem sido retirados dessa pastagem onde crescia a árvore, para um piquete contendo guandú. Os animais, em geral, não apresentavam sintomas de intoxicação, estavam apenas indolentes. Dois animais, ocasionalmente, foram vistos antes de morrer, um dêles inesperadamente saiu correndo, indo bater contra um barranco, caindo morto, e o outro contra uma árvore, depois uma cêrca, morrendo".

Experiências com fôlhas coletadas nos meses de setembro e outubro de 1958.

Cobaia 1 — (290 g) Recebeu, por via intraperitonial o extrato de 10 g de fôlhas. Amanheceu morta.

Cobaia 2 — (315 g) Recebeu, por via intraperitonial o extrato de 8 g de fôlhas. Amanheceu morta.

Cobaia 3 — Recebeu, por via intraperitonial o extrato de 5 g de fôlhas. Normal.

Cobaia 4 — (208 g) Recebeu, por via intraperitonial o extrato de 5 g de fôlhas. Normal.

Cobaia 5 — (240 g) Recebeu, por via intraperitonial o extrato de 2,5 g de fôlhas. Normal.

Coelho 1 — Recebeu fôlha como alimento verde pelo espaço de 4 dias. Normal.

Experiências com frutos.

Cobaia 1 — Recebeu, por via intraperitonial o extrato de 2,8 g (1 fruto). Morreu ao fim de 1 hora e 50 minutos.

Cobaia 2 — (283 g) Recebeu, por via intraperitonial o extrato de 3,8 g de frutos (sêcos). Amanheceu morta.

Cobaia 3 — Recebeu, por via intraperitonial o extrato do resíduo da extração de um fruto. (o primeiro extrato foi injetado no coelho 1). Morreu ao fim de 2 horas.

Cobaia 4 — Recebeu, por via gástrica o extrato de 10,2 g de frutos. Morreu ao fim de 2 horas e 30 minutos.

Coelho 1 — Recebeu, por via intraperitonial o extrato de 1 fruto, (1,9 g) às 14,20 horas. Morreu ao fim de 60 minutos. *Sintomas*:

às 14,20 o coelho apresenta sintomas de grande excitação, aceleração do ritmo respiratório, emite fezes e urina.
às 14,30 horas — Fica em decúbito dorsal, ofegante, não se mantém em pé.
às 15,10 horas — Animal completamente sem movimentos, respira lentamente.
às 15,20 horas — Morre.
Os sintomas apresentados pelos animais que receberam o extrato de fruto por via intraperitonial são em geral semelhantes a êstes.

Coelho 2 — Recebeu, por via intraperitonial o extrato de 2,6 g de frutos. Morreu ao fim de 1 hora e 25 minutos.

Coelho 3 — Recebeu, por via gástrica três doses em dias consecutivos, do extrato de frutos, 5,3, 16,6 e 10 g respectivamente. Foi sacrificado após 3 dias. *Necropsia*: foi constatada hemorragia no estômago e intestinos, destacamento da mucosa gástrica.

Coelho 4 — Recebeu, por via gástrica o extrato de 30,3 g de frutos. Amanheceu morto. A necropsia revelou o mesmo quadro que o anterior.

Coelho 5 — Recebeu, por via gástrica o extrato de 26,2 g de frutos. Foi sacrificado após três dias. A necropsia não revelou nada de anormal.

Coelho 6 — Recebeu, por via gástrica o extrato de 40 g de frutos. Amanheceu morto.

Coelho 7 — Recebeu, por via gástrica o extrato de 27,7 g de fruto. 6 dias após recebeu nova dose do extrato de frutos frescos, 40 g. Amanheceu morto.
Exame histológico realizado pelo Dr. Paulo C. Bueno(*). Necrose da superfície da mucosa gástrica com conseqüentes hemorragias. Degeneração granular de numerosas células hepáticas. Congestão dos capilares do miocárdio.

Coelho 8 — (2,790 kg) (16/9/58) Recebeu, por via gástrica, 20 ml do extrato de 18,5 g de frutos. Em 19/9/58 recebeu nova dose do extrato correspondente a 30 g. Ao fim de 12 horas, a partir da administração, o animal começou a dar pulos e gritos, morrendo no fim de alguns minutos.

Garrote 1 — (148 kg) Mestiço de holandês e zebu. Em 1/10/58 recebeu o extrato de 750 g de frutos por via oral. Recebeu, em 6/10, por bôca, 150 g de frutos triturados e, em 8/10, 700 g de sementes. Pêso do garrote em 13/10: 133 kg. Animal com aspecto normal. Recebeu por boca, de 14/10 a 18/10, 400 g de frutos triturados. Sintomas apresentados: emagrecimento, indolência e sonolência. Morreu 20 dias após o início da administração.
Necropsia realizada por Dr. J. C. de Queiroz(**).

(*) Chefe de Seção de Anatomia Patológica — Instituto Biológico.
(**) Secção de Parasitologia Animal — Instituto Biológico.

Estado geral: magro, pêlos sem brilho, com corrimento sanguíneo nas narinas.
Estado: decúbito lateral direito, membros distendidos.
Gânglios hemolinfáticos bem aumentados. Gordura periganglionar de coloração amarelada. Os ossos fáceis de serem cortados.
Pulmão: nos lóbulos anteriores, hemorragia difusa e os posteriores, enfizematosos.
Coração: líquido pericárdico hemorrágico, quantidade apreciável, coração em sístole, vasos túrgidos.
Rumen: distendido, mucosa destacando com muita facilidade, com zonas hemorrágicas, conteúdo estomacal líquido com pequena quantidade de alimento. No abomaso regular quantidade de areia. Retículo com a mucosa destacável com facilidade.

Baço: hipertrofiado e, na região do ilo, uma área hemorrágica grande. Côr violeta escuro.

Fígado: côr amarelada, grandes áreas com um amarelo mais intenso; ao corte notaram-se também zonas bem amarelas. Vesícula biliar hipertrofiada, bilis amarela de aspecto xaroposo; colédoco normal.

Rins: de tamanho normal, com áreas amareladas, gordura perirenal amarelada.

Intestinos: com algumas áreas hemorrágicas, principalmente no intestino grosso, mucosa intestinal também se destacando.

Garrote 2 — (208 kg) preto, mestiço, holandês e zebu.
Em 2/10/58 recebeu por via oral o extrato de 1 kg. de frutos.
Em 7/10/58 recebeu por boca 1 kg de frutos triturados.

Exames clínicos realizados pelo Dr. L. B. S. Amaral(*):
Dia 9/10/58 — *Estado geral* — Bovino mais ou menos de 6 meses de bôa constituição.

Estado de nutrição — Regular.

Atitude — Apático.
Pêlos sem brilho, elasticidade cutânea diminuida.
Mucosas visíveis descoradas (anemia discreta), olhos fundos (desidratação), midríase.

Temperatura — 39° C.

Aparelho respiratório — 24 movimentos por minuto.
Pulso — Débil e rápido — 180 batimentos por minuto. Anorexia, sêde diminuida e indiferênça ao meio ambiente.
Dia 10/10/58 — indiferença ao meio ambiente, sialorréia profusa, andar cambaleante, midríase acentuada e anorexia.
Dia 13/10/58 — grande perda de pêso, desidratação, pêlos sem brilho e elasticidade cutânea diminuida; paresia dos membros posteriores com andar cambaleante (ataxia), parecendo não mais enxergar (midríase acentuada).

Dia 12/10/58 — articulações carpianas aumentadas, à palpação mostrando flutuação sem calor (Estampa 12). O animal perma-

(*) Chefe da Secção de Assistência Veterinária — Instituto Biológico.

nece indiferente, não mais reagindo a estímulos exteriores, até a morte, que ocorreu em 25/10/58.

Nota: O Camboatá é empregado como árvore de sombreamento em pastagens (5), embora o animal não coma o fruto, provàvelmente pelo seu sabor, é possível ocorrerem intoxicações, como neste caso, porque os bovinos, ao procurarem comer as fôlhas, ingeriram também os frutos, o que vem evidenciar as estampas anexas (10, 11 e 12).

Resultado — Positivo.

ONAGRÁCEAS

Jussiaea elegans CAMB.

Nome comum — Cruz de Malta.
Origem — Município de Campinas.
Material em bôas condições.

Experiências realizadas com plantas coletadas em março de 1958.

Cobaia 1 — Recebeu, por via intraperitonial, 4,5 ml do extrato de 5 g da planta. Normal três dias após a administração.
Cobaia 2 — Recebeu, por via intraperitonial o extrato de 3 g da planta. Normal.

Resultado — Negativo.

Jussiaea sericea CAMB.

Nome comum — Cruz de Malta.
Origem — Município de Campinas.
Material em bôas condições.

Experiências realizadas com plantas coletadas em janeiro de 1958.

Cobaia 1 — Recebeu, por via intraperitonial, 2 ml do extrato de 2 g da planta. Normal.

Cobaia 2 — Recebeu, por via intraperitonial o extrato de 3 g da planta. Normal.

Cobaia 3 — Recebeu, por via gástrica, 15 ml do extrato de 15 g da planta. Normal.

Resultado — Negativo.

Jussiaea suffruticosa L. var. *ligustrifolia* (H. B. K.) Griseb

Estampa 13

Nome comum — Cruz de Malta.
Origem — Município de Campinas.
Material em bôas condições.

Amostras coletadas em diversos meses apresentaram em geral o mesmo grau de toxidez.

Cobaia 1 — (400 g) Recebeu, por via intraperitonial o extrato de 5 g da planta. Morreu no mesmo dia.

Cobaia 2 — (460 g) Recebeu, por via intraperitonial, 2 ml do extrato de 3 g da planta. Amanheceu morta.

Cobaia 3 — (345 g) Recebeu, por via intraperitonial o extrato de 1,5 g da planta, as 9,20 horas. Sintomas: 11 horas — pêlos iriçados, grande excitação e desequilíbrio, êstes sintomas se prolongaram até a morte do animal às 18,50 horas do mesmo dia. *Necropsia*: hemorragia discreta nos órgãos abdominais.
Êste é o quadro apresentado em geral pelas cobaias injetadas com o extrato salino da planta.

Cobaia 4 — (305 g) Recebeu, por via intraperitonial o extrato de 150 mg da planta (planta sêca). Amanheceu morta.
A administração intraperitonial de extratos da planta (sêca) na proporção aproximada de 500 mg por kg de pêso, levam as cobaias à morte dentro de 20 horas.

Cobaia 5 — (350 g) Recebeu, por via gástrica duas doses consecutivas do extrato da planta e por mais dois dias recebeu 5 g da planta triturada com farelo; total 20 gramas. Foi encontrada morta 8 dias após ter recebido a 1.ª dose. *Necropsia*: retensão de bilis e urina. Pulmão hiperemiado com pontos hemorrágicos, rins aumentados com hemorragias puntiformes.

Cobaia 6 — Recebeu, as mesmas doses que a cobaia 5. Morreu 8 dias após ter recebido a 1.ª dose. Na véspera de morrer o animal estava aparentemente normal. Sintomas que precederam a morte: Na 1.ª fase, que durou cêrca de seis horas, prostração e respiração lenta. Na 2.ª fase, o animal teve espaçadamente contorções do corpo e distenção dos membros dianteiros, morrendo ao fim de duas horas. *Necropsia*: grande retenção de bilis e urina. Pulmão hiperemiado com pontos hemorrágicos, rins com hemorragias puntiformes.

Resultado — Positivo.

Nota: Baseado nos resultados obtidos, distribuição geográfica da planta e nos trabalhos encontrados na literatura (*6* e 7) esta planta foi selecionada para a identificação de seu conteúdo tóxico, e os estudos estão em andamento.

Jussiaea suffruticosa L. var. *sessiliflora* (MICH) HASSLER

Nome comum — Cruz de Malta.
Origem — Município de Campinas.
Material em bôas condições.

Experiências realizadas com plantas coletadas no mês de maio de 1958.

Cobaia 1 — Recebeu, por via intraperitonial, 5 ml do extrato de 5 g da planta. Amanheceu morta três dias após a administração.

Cobaia 2 — Recebeu, por via intraperitonial, 5 ml do extrato de 5 g da planta. Amanheceu morta.

Cobaia 3 — Recebeu, por via intraperitonial, 3,5 ml do extrato de 3 g da planta. Morreu ao fim de 19 horas.

Cobaia 4 — Recebeu, por via intraperitonial, 2 ml do extrato de 3 g da planta. Cobaia normal dois dias após a administração.

Cobaia 5 — Recebeu, por via intraperitonial, 1 ml do extrato de 800 mg da planta. Normal.

Resultado — Negativo.

Nota: Apesar das provas indicarem ser esta planta não tóxica, outras experiências deverão ser feitas para comprovar êstes resultados.

FITOLACÁCEAS

Phytolacca thyrsiflora FENZL

Estampa 14

Nome comum — Carurú selvagem.
Origem — Arredores de São Paulo.
Material em bôas condições.

Experiências realizadas com plantas coletadas nos meses de setembro, outubro e novembro de 1958.

Cobaia 1 — (320 g) Recebeu, por via intraperitonial, 3 ml do extrato de 2 g de fôlhas. Morreu dentro de 20 minutos.

Cobaia 2 — Recebeu, por via intraperitonial, 3 ml do extrato de 1 g de fôlhas. Morreu dentro de 45 minutos.

Cobaia 3 — (320 g) Recebeu, por via intraperitonial, 1,5 ml do extrato de 1 g de fôlhas. Aparentemente normal após decorrerem dois dias.

Cobaia 4 — Recebeu, por via intraperitonial, 1,5 ml do extrato de 500 mg de fôlhas. Amanheceu morta.

Cobaia 5 — (260 g) Recebeu, por via intraperitonial o extrato de 500 mg de fôlhas. Normal.

Cobaia 6 — (285 g) Recebeu, por via intraperitonial, 2,2 ml do extrato de 2 g de fruto. Amanheceu morta.

Cobaia 7 — (270 g) Recebeu, por via intraperitonial, 1,1 ml do extrato de 1 g de fruto. Amanheceu morta.
Necropsia: Forte hiperemia dos órgãos abdominais.

Cobaia 8 — (285 g) Recebeu, por via intraperitonial o extrato de 500 mg de fruto. Amanheceu morta.

Cobaia 9 — (265 g) Recebeu, por via intraperitonial, 4,5 ml do extrato de 250 mg do fruto. Amanheceu morta.

Cobaia 10 — (453 g) Recebeu, por via intraperitonial, 4,5 ml do extrato de 250 mg de fruto. Morreu dentro de 40 minutos.

Coelho 1 — (1,890 kg) Recebeu, como alimento verde, *Phytolacca* e farelo por quatro dias consecutivos. No quinto dia amanheceu morto. O animal alimentou-se bem só nos dois primeiros dias. Pêso inicial 1,890 kg. Após 5 dias, 1,430 kg.

Coelho 2 — Recebeu, como alimento verde, *Phytolacca* e farelo do dia 13/10 a 24/10. Morreu neste dia às 12 horas. Alimentou-se bem só nos primeiros dias, tornando-se depois indiferente ao alimento e o ambiente. Nos últimos dias, as fezes continham bastante muco e o animal apresentava uma côr branco amarelada nas orelhas e focinho. *Necropsia*: áreas hemorrágicas no estômago e intestinos, destacamento da mucosa gástrica, suco biliar de côr verde escura e de aspecto gelatinoso.

Coelho 3 — (2,750 kg) Em 21/10/59 recebeu, por via gástrica, 40 ml do extrato de 30 g de frutos. O coelho permaneceu a maior parte do tempo deitado indiferente ao alimento que recebia (farelo e capim). Amanheceu morto no quinto dia após o início da administração. *Necropsia*: áreas hemorágicas no estômago e intestinos, destacamento da mucosa gástrica.

Coelho 4 — Recebeu, por via gástrica o extrato de 40 g de frutos. Morreu após quatro dias.

Coelho 5 — (2,415 kg) Recebeu, por via gástrica, nos dias 22, 23 24 e 27/10, o extrato correspondente a 388 g de fôlhas e frutos. Morreu no dia 30/10. Exame histo-patológico realizado pelo Dr. Paulo Bueno. *Resultado*: Nefrose albuminoide de pequeno grau. Hemorragias na mucosa gástrica.

Coelho 6 — (2,570 kg) Recebeu, por via gástrica o extrato de 623 g de fôlhas durante 13 dias. Coelho normal.

Cobaia 11 — (380 g) Recebeu, por via intraperitonial, 2,6 ml do extrato de 2 g de raiz. Morreu ao fim de 15 horas.

Cobaia 12 — Recebeu, por via intraperitonial o extrato de 500 mg de raiz. Dois dias após a administração amanheceu morta.

Galinha 1 — Recebeu, por via oral, nos dias 19, 20 e 22/11/58, o total de 79 g de frutos. A galinha botava ovos diàriamente até o dia 22/11; nesta data parou a postura, reniciando ao fim de 13 dias. Ficou em observação até 2/5/59. Normal.

Galinha 2 — (19/11/58) Recebeu, por via oral nos dias 19 e 20/11 o total de 47 g de frutos. A falha na postura de óvos nesta galinha foi semelhante a anterior. Ficou em observação até 5/2/59. Normal.

Resultado — Positivo.

Nota: Os dados apresentados indicam serem os frutos bastante tóxicos.

Baseado na literatura, nesta família as seguintes espécies são tóxicas: *Phytolacca dodecandra* (*25*), *Phytolacca dioica* (*26* e *27*) e *Phytolacca australis* (*28*).

POLIPODIÁCEAS

Trismeria trifoliata (L.) DIELS.

Nome comum — ...
Origem — Município de Campinas.
Material em bôas condições.

Cobaia 1 — (29/1/58) Recebeu, por via intraperitonial, 15 ml do extrato de 20 g da planta. No dia seguinte recebeu por via intraperitonial o extrato de 4,4 g da planta. Normal.

Resultado — Negativo.

POLIGALIÁCEAS

Monnina richardiana ST. HIL.

Nome comum — ...
Origem — Arredores de São Paulo.
Material em bôas condições.

Experiências realizadas com plantas coletadas no mês de outubro de 1958.

Cobaia 1 — (385 g) Recebeu, por via intraperitonial, 6,5 ml do extrato de 5 g da planta. Normal.

Cobaia 2 — (280 g) Recebeu, por via intraperitonial, 3,9 ml do extrato de 3 g da planta. Amanheceu morta.

Cobaia 3 — (410 g) Recebeu, por via intraperitonial, 3,9 ml do extrato de 3 g da planta. Normal.

Cobaia 4 — (358 g) Recebeu, por via intraperitonial, 1,3 ml do extrato de 1 g da planta. Normal.

Resultado — Negativo.

POLIGONÁCEAS

Rumex crispus L.

Nome comum — ...

Origem — Arredores de São Paulo.

Material em bôas condições.

Experiências realizadas com material coletado no mês de outubro de 1958.

Cobaia 1 — (440 g) Recebeu, por via intraperitonial, 5 ml do extrato de 5 g de fôlhas. Amanheceu morta.

Cobaia 2 — (440 g) Recebeu, por via intraperitonial, 3 ml do extrato de 3 g de fôlhas. Aparentemente normal.

Cobaia 3 — Recebeu, por via intraperitonial, 1,5 ml do extrato de 500 mg de fôlhas. Aparentemente normal.

Cobaia 4 — (440 g) Recebeu, por via intraperitonial, 5 ml do extrato de 5 g de fruto. Aparentemente normal.

Cobaia 5 — (420 g) Recebeu, por via intraperitonial, 3 ml do extrato de 3 g de fruto. Aparentemente normal.

Cobaia 6 — (410 g) Recebeu, por via intraperitonial, 1 ml do extrato de 1 g de fruto. Aparentemente normal.

Cobaia 7 — Recebeu, por via intraperitonial, 3 ml do extrato de 1 g de fruto. Aparentemente normal.

Cobaia 8 — Recebeu, por via intraperitonial, 1,5 ml do extrato de 500 mg de frutos. Aparentemente normal.

Cobaia 9 — Recebeu, por via intraperitonial, 0,75 ml do extrato de 250 mg de frutos. Aparentemente normal após três dias.

Coelho 1 — (2,970 kg) Recebeu, diàriamente, como alimento verde, 100 g da planta pelo espaço de uma semana. Normal.

Tôdas as cobaias injetadas com o extrato de frutos ou de fôlhas, apresentaram fortes convulsões pelo espaço de alguns minutos, após a administração.

Resultado — Negativo?

Nota: Embora a administração de extratos do *Rumex crispus* L., por via gástrica, não tenha levado o animal à morte, pode-se considerar esta planta nociva (*12*) por causar irritação da pele, das membranas mucosas e também do aparelho digestivo em carneiros e cavalos.

PONTEDERIÁCEAS

Heteranthera reniformis Ruiz & Pav.

Nome comum — Cicuta de agrião.
Origem — Município de Campinas.
Material em bôas condições.

Experiências realizadas com plantas coletadas em fevereiro de 1958.

Cobaia 1 — (384 g) Recebeu, por via intraperitonial, 4 ml do extrato de 5 g da planta. Após a administração o animal ficou com o pêlo eriçado, teve convulsões e tremores. Amanheceu morto.

Cobaia 2 — (380 g) Recebeu, por via intraperitonial, 1,5 ml do extrato de 3 g da planta. Apresentou sintomas semelhantes ao animal anterior. Amanheceu morta.
Necropsia: Hemorragia generalizada nos órgãos abdominais.

Cobaia 3 — (340 g) Recebeu, por via intraperitonial o extrato de 1,5 g da da planta. Animal normal.

Experiências realizadas com plantas coletadas nos meses de outubro e novembro de 1958.

Cobaia 4 — (360 g) Recebeu, por via intraperitonial, 3 g do extrato da planta. Amanheceu morta.

Cobaia 5 — (350 g) Recebeu, por via intraperitonial, 2,5 g do extrato da planta. Amanheceu morta.

Cobaia.6 — (350 g) Recebeu, por via intraperitonial, 1 g do extrato da planta, às 18,30 horas. Morreu no dia seguinte às 11,45 horas.
Necropsia: Hemorragia generalizada nos órgãos abdominais.

Coelho 1 — (2,300 kg) Recebeu, por via gástrica, 45 ml do extrato de 50 g da planta. Normal.

Coelho 2 — Recebeu, em 3 dias consecutivos a partir de 29/10/58, por via gástrica, 40 g do extrato da planta. Normal.

Coelho 3 — (3 kg) Recebeu, no espaço de 13 dias, de 22/11 a 9/12 aproximadamente 3 kg do *Heteranthera* como alimento verde e farelo. Ficou em observação até 5/1/59. Normal.

Resultado — Negativo.

RUBIÁCEAS

Coccocypselum lanceolatum (Ruiz & Pav.) Pers.

Nome comum — ...
Origem — Arredores de São Paulo.
Material em bôas condições.

Experiências realizadas com plantas coletadas no mês de setembro de 1958.

Cobaia 1 — (1/9/58) Recebeu, por via intraperitonial, 2 ml do extrato de 650 mg de fruto. Após a injeção o animal teve convulsões. Após 5 horas ficou com os pêlos arrepiados, sonolento. Normal em 3/9/58.

Cobaia 2 — Recebeu por via intraperitonial 5 ml do extrato de 5 g de fôlhas e caule. Normal.

Cobaia 3 — Recebeu, em 1/9/58, por via intraperitonial, 2 ml do extrato de 1 g de fôlhas e caule. Normal após 48 horas.

Cobaia 4 — Recebeu por via intraperitonial 1 ml do extrato de 600 mg de fôlhas e de caule. Normal.

Resultado — Negativo.

Palicouria cujabensis Schlchtd.

Nome comum — ...

Origem — Fazenda Rosanela — Presidente Prudente.

Material em bôas condições, recebido em novembro de 1958.

Cobaia 1 — Recebeu, por via intraperitonial o extrato de 9 g da planta. Amanheceu morta.

Cobaia 2 — Recebeu, por via intraperitonial o extrato de 5 g da planta. Normal.

Cobaia 3 — Recebeu, por via intraperitonial o extrato de 3 g da planta. Normal.

Cobaia 4 — Recebeu, por via intraperitonial o extrato de 2,5 g da planta. Normal.

Cobaia 5 — Recebeu, por via intraperitonial o extrato de 1 g da planta. Normal.

Coelho 1 — Recebeu, por via gástrica o extrato de 53,5 g da planta. Normal.

Resultado — Negativo.

Relbunium hypocarpium (L.) HEMSL.

Nome comum — ...
Origem — Arredores de São Paulo.
Material em bôas condições.

Experiências realizadas com plantas coletadas em novembro de 1958.

Cobaia 1 — Recebeu, por via intraperitonial o extrato de 5 g da planta. (caule, fôlhas e frutos). Normal.

Cobaia 2 — Recebeu, por via intraperitonial o extrato de 2,5 g da planta completa. Normal.

Cobaia 3 — Recebeu, por via intraperitonial o extrato de 1 g da planta completa. Normal.

Coelho 1 — Em 2/12/58 recebeu, por três dias consecutivos, por via gástrica, o extrato de 60 g da planta. Normal em 16/12/58.

Resultado — Negativo.

TRIGONÁCEAS

Trigonia nivea CAMB.

Nome comum — Cipó de Paina.
Origem — Município de Campinas.
Material em bôas condições.

Experiências realizadas com plantas coletadas em fevereiro e outubro de 1958.

Cobaia 1 — (550 g) (3/2/58) Recebeu, por via intraperitonial, 3 ml do extrato de 5 g da planta. Aparentemente normal.

Cobaia 2 — (4/5/58) Recebeu, por via intrapertonial, 2,5 ml do extrato de 5 g de fôlhas. Normal em 7/5/58.

Cobaia 3 — (11/2/58) Recebeu, por via intraperitonial, 2,2 ml do extrato de 2,4 g de fôlhas. Morreu após 17 horas.

Cobaia 4 — (305 g) (30/10/58) Recebeu, por via intraperitonial, 1,5 ml do extrato de 1 g de fôlhas. Normal.

Cobaia 5 — (320 g) (30/10/58) Recebeu, por via intraperitonial, 1 ml do extrato de 500 mg de fôlhas. Normal.

Coelho 1 — (2,200 kg) (13/2/58) Recebeu, por via intraperitonial o extrato de 8 g da planta. Morreu ao fim de 19 horas.
Necropsia: Hemorragia generalizada nos órgãos abdominais.

Coelho 2 — (2,250 kg) Recebeu, por via gástrica, a partir de 28/10/58, cêrca de 463 g de fôlhas, em pequenas doses, pelo espaço de 15 dias. Normal.

Resultado — Negativo.

UMBELÍFERAS

Apium ammi (Jacq.) Urb.

Nome comum — ...
Origem — Município de Campinas.
Material em bôas condições.

Cobaia 1 — (21/3/58) Recebeu, por via intraperitonial o extrato de 5 g da planta. Amanheceu morta.

Cobaia 2 — (420 g) (24/3/58) Recebeu, por via intraperitonial o extrato de 3 g da planta. Normal.

Resultado — Negativo.

RESUMO

Foram estudadas 37 plantas procedentes do Estado de São Paulo.

26 plantas foram inócuas, e 4 continuam suspeitas porque a quantidade de material recebido não foi suficiente para todos os testes de toxidez.

Baseado nas experiências por nós realizadas neste trabalho, as seguintes plantas são tóxicas: *Elvira biflora, Euphorbia peplus L., Indigofera endecaphylla, Guarea trichilioides L., Jussiaea suffruticosa L.* var. *ligustrifolia* e *Phytolacca thyrsiflora* Fenzl.

Embora as plantas mencionadas neste trabalho não tenham toxidez elevada como a "erva de rato", muito conhecida entre nós e que leva o animal a morte pela ingestão de 0,65 g. de fôlhas por quilo de pêso do animal (*31*), estas plantas são apontadas como tóxicas causando a morte se ingeridas em quantidades suficientes ou causando lesões internas que vêm prejudicar a saúde dos animais.

Na literatura internacional encontramos também algumas indicações.

Na família das Euphorbiáceas, além da *Euphorbia peplus,* várias espécies foram mencionadas como tóxicas (*8* e *1*).

A *Phytolacca thyrsiflora* não foi pròpriamente descrita na literatura, porém, a *Phytolacca americana* e outras espécies são conhecidas.

Dentro da família Onagraceae a *Jussiaea peruviana* causava anualmente a morte de um número elevado de bovinos que pastavam por uma ou duas semanas em campos onde esta planta era abundante.

O *Rumex crispus* L., embora não tenha toxidez elevada, provàvelmente não levando o animal a morte, pode ser considerado como planta nociva por causar irritação da pele, das membranas mucosas e também do aparelho digestivo de animais.

AGRADECIMENTOS

Nossos agradecimentos ao Dr. E. E. Trapp chefe da Secção de Enzootias dêste Instituto, pela contribuição prestada no decorrer dêstes trabalhos.

INVESTIGATIONS ON TOXIC PLANTS IN THE STATE OF SÃO PAULO, BRAZIL

Abstract

37 plants from the State of São Paulo have been studied, 26 are harmless, 4 are being studied, 6 are poisonous and one may occasionally be harmfull.

Based on the experiments done, the following plants are poisonous: Elvira biflora, Euphorbia peplus L., Indigofera endecaphylla Jaqc., Guarea trichilioides L., Jussiaea suffruticosa L. var. ligustrifolia and Phytolacca thyrsiflora Fenzl.

Though, the plants listed above are not so dangerous like "Palicourea Margravii" (31), 650 mg. of this plant per Kg. weight are sufficient to induce fatal poisoning in cattle, these plants, however, may produce death or diseases, depending upon whether an animal eats a large quantity of the plants at one time or small quantities repeatedly for a considerable time. Toxicity of Elvira biflora varies during the plant growing, it is high in the flowering state, its poisonous principle is a saponin (32).

"Camboatá" (Guarea trichilioides L.) a native tree of Brazil contains a poison especially in its fruits. Euphorbia peplus, like others Euphorbiaceae should contain toxic substances in their latex.

Jussiaea suffruticosa L. var. ligustrifolia (33) probably has the same toxic principle of the Jussiaea peruviana, many animals in Peru are poisoned when grazing in a pasture infested with that plant (29).

Rumex crispus L., causes irritation of the skin and mucous membranes, also of the digestive system in animals.

BIBLIOGRAFIA

1 — Long, Harold, C. — 1924 — Plants Poisonous to livestock. Cambridge Univ. Press. 120 pg.

2 — Hoehne, F. C. — 1939 — Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais. Graphicars. S. Paulo.

3 — Moraes Mello, E. M. & J. Sampaio Fernandes — 1941 — Contribuição ao estudo das plantas tóxicas brasileiras. Ministério da Agricultura. Dep. Nacional de Produção Animal. Rio de Janeiro.

4 — Rocha e Silva, M. — 1940 — O problema das plantas tóxicas no Estado de São Paulo. *Biológico*, **6**: 59-66.

5 — Rocha e Silva, M. — 1940 — Fotossensibilização em bovinos. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, **11**: 461-488.

6 — Torres, S. & C. S. Fernandes — 1941 — A flora de Pernambuco e a Patologia Animal. *Arq. Inst. Pesq. Agron. de Pernambuco*, **3**: 35-63.

7 — Rocha e Silva, M. — 1943 — Estudos sôbre plantas tóxicas no Estado de São Paulo. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, **14**: 15-30.

8 — Muenscher, W. C. — 1939 — Poisonous Plants of the United States. The Macmillan Company, N. York, 266 pg.

9 — Elisev, E. — 1947 — Subsídio para o estudo das plantas tóxicas em Angola. Pecuária. *An. Serv. Vet. e Ind. Animal*, **1**: 261-272.

10 — Stoddant, L. A., A. H. Holmgren & C. W. Cook — 1949 — Important Poisonous Plants of Utah. Special Report n.º 2. Utah State Agricultural College. Agricultural Exp. Stations, 22 pg.

11 — Welch, H. & H. E. Morris — 1952 — Range plants poisonous to livestock in Montana. Circular 197. Montana State College. Agricultural Exp.

12 — West, E. & M. W. Emmel — 1952 — Poisonous Plants in Florida. Bulletin 510. Univ. Florida. Agricultural Exp. Stations, 58 pg.

13 — Ragonese, A. E. — 1955 — Plantas tóxicas para el ganado. *Rev. Fac. de Agron.*, La Plata, **31**: 133-353.

14 — Speny, O. E. et col. — 1955 — Texas Range Plants Poisonous to livestock. Bulletin 796. Texas Agricultural Exp. Station, 46 pg.

15 — Gilkey, Helen M. — 1958 — Livestock-Poisoning Weeds of Oregon. Bulletin 564, Oregon State College. Agricultural Exp. Stations, 74 pg.

16 — González, M. H., & Fiacro Martínez Martínez — 1958 — Las plantas tóxicas al ganado. Folleto de Divulgación N.º 28. Secretaria de Agricultura y Ganaderia, Mexico.

17 — Curson, H. H. — 1928 — Some little known South African Poisonous plants and their effects on Stock. 13th and 14th Reports, Union of South Africa. Dept. of Agric., Veter, Education and Research., part 1, 205-233.

18 — Sund, J. M. & M. J. Wright — 1959 — Control weeds to prevent lowland abortion in cattle. *Down to Earth*, **15**: 10-13.

19 — Younge, O. R., J. C. Ripperton & M. Takahashi — 1951 — Creeping Indigo investigations. Biennial Report Hawaii Agr. Exp. Sta. (1948-50), 42-46.

20 — Nordfeldt, Sam & col. — 1951 — Creeping Indigo as feed for cattle, sheep and rabbits. Biennial Report Hawaii Agr. Exp. Sta. (1948-50), 61.

21 — Hutton, E., M., G. M. Windrum & C. C. Kratzing — 1957 — Studies on the toxicity of *Indigofera endecaphylla*. 1 Toxicity for rabbits. *J. Nutr.*, **64**: 321-33.

22 — Steyn, D. G. — 1933 — Poisoning of Human Beings by weeds contained in cereals. Onderstepoort J. Vet. Science and Animal Ind., **1**: 219-266.

23 — Pio Corrêa, M. — 1931 — Dicionário de plantas úteis do Brasil, Ministério da Agricultura, **2**: 77.

24 — Gardner, C. & N. W. Bennetts — 1956 — The toxic plants of Western Australia. West Australian Newspapers Ltd.

25 — Mezey, K. — 1942 — Toxicidad y accion farmacodinamica de la *Jussiaea peruviana* Linn. *Rev. Med. Vet.*, Bogotá, **11**: 617-627.

26 — Mettan, R. W. M. — 1939 — Poisoning by *P. dodecandra* Fawile Phitolaccaceae. *Vet. J.*, **95**: 135-138.

27 — Steyn, D. G. — 1935 — Recent Investigations into the toxicity of known and unknown poisonous plants in the Union of South Africa. *Onderstepoort J. Vet. Science and Animal Ind.*, **4**: 399-415.

28 — Garcia, J. A. R. — 1941 — On the popular belief in the toxicity of ombu leaves (*P. dioica*). *An. Fac. Vet. Montevideo*, **3**: 501-504.

29 — Mezey, K. — 1943 — Toxicology of *P. australis*. *Rev. Med. vet.*, Bogotá, **12**: 101-107.

30 — Gilkey, H. M. — 1958 — Livestock poisoning weeds of Oregon. Agr. Exp. Sta., Bulletin 564, pg. 64.

31 — Carneiro, V. & Genesio Pacheco — 1932-33 — Estudos sôbre plantas tóxicas. Intoxicação de animais pela "Erva de rato da mata". *Rev. Ind. anim.*, N.º 8-10: 861-872.

32 — Andrade, Sylvia O. & Marilda M. Oliveira — 1959 — Estudos sôbre o efeito tóxico da planta *"Elvira biflora"*. XI Congresso da Soc. Brasileira para o Progresso da Ciência. Bahia.

33 — Holzhacker, Elisabeth L. & Silvia O. Andrade — 1959 — Isolamento do princípio tóxico da "Cruz de Malta". XI Congresso da Soc. Brasileira para o Progresso da Ciência — Bahia.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 7

Fig. 1 — *Elvira biflora,* planta com altura aproximada de 70 cm, desenvolve-se em terreno sêco. Foi isolado desta planta uma saponina tóxica.

Fig. 2 — Plantação de *Elvira biflora* em terreno do Instituto Biológico.

Estampa 8

Fig. 3 — *Euphorbia peplus* L., planta com altura aproximada de 30 cm. Como é típico nas euphorbiáceas, em cada ferimento feito nesta planta brota imediatamente o latex.

Estampa 9

Fig. 4 — Detalhes da leguminosa *Indigofera endecaphylla.*

Fig. 5 — Podemos observar como a *Indigofera endecaphylla* se desenvolve bem ao lado do capim. Plantação feita em terreno do Instituto Biológico.

Estampa 10

Fig. 6 — Camboatá empregado como árvore de sombreamento, na pastagem onde ocorreram as intoxicações dos bovinos (Faz. Piraí). Podemos vêr na parte inferior da copa galhos que estavam ao alcance dos animais sem fôlhas e frutos.

Estampa 11

Fig. 7 — Êste ramo do Camboatá nos dá idéia da quantidade de frutos existentes na árvore.

Estampa 12

Fig. 8 — Detalhe de um ramo de Camboatá.

Fig. 9 — Garrote n.º 2 (208 quilos). Experiência com frutos do Camboatá. Esta fotografia foi tirada 5 dias antes de ocorrer a morte do animal êle estava magro e com as articulações aumentadas (carpianas).

Estampa 13

Fig. 10 — *Jussiaea suffruticosa* L. var. *ligustrifolia* (H. B. K.) Griseb., nome popular "Cruz de Malta", esta planta vegeta em lugares úmidos e a margem de rios e lagoas (*23*).

Estampa 14

Fig. 11 — *Phytolacca thyrsiflora* Fenzl. Erva alta e perene muito comum em quintais e taperas é um dos vegetais que primeiramente surgem após as derrubadas e queimadas habituais (*23*).

Fig. 1

Fig. 2

Fig. 3

Fig. 4

Fig. 5

Fig. 6

Fig. 7

Fig. 8

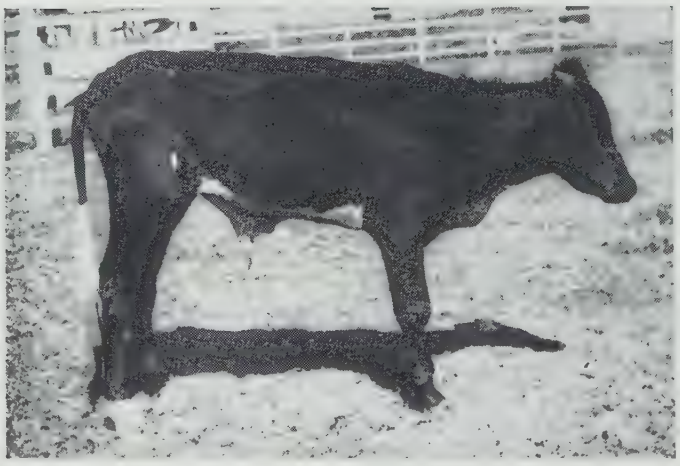


Fig. 9

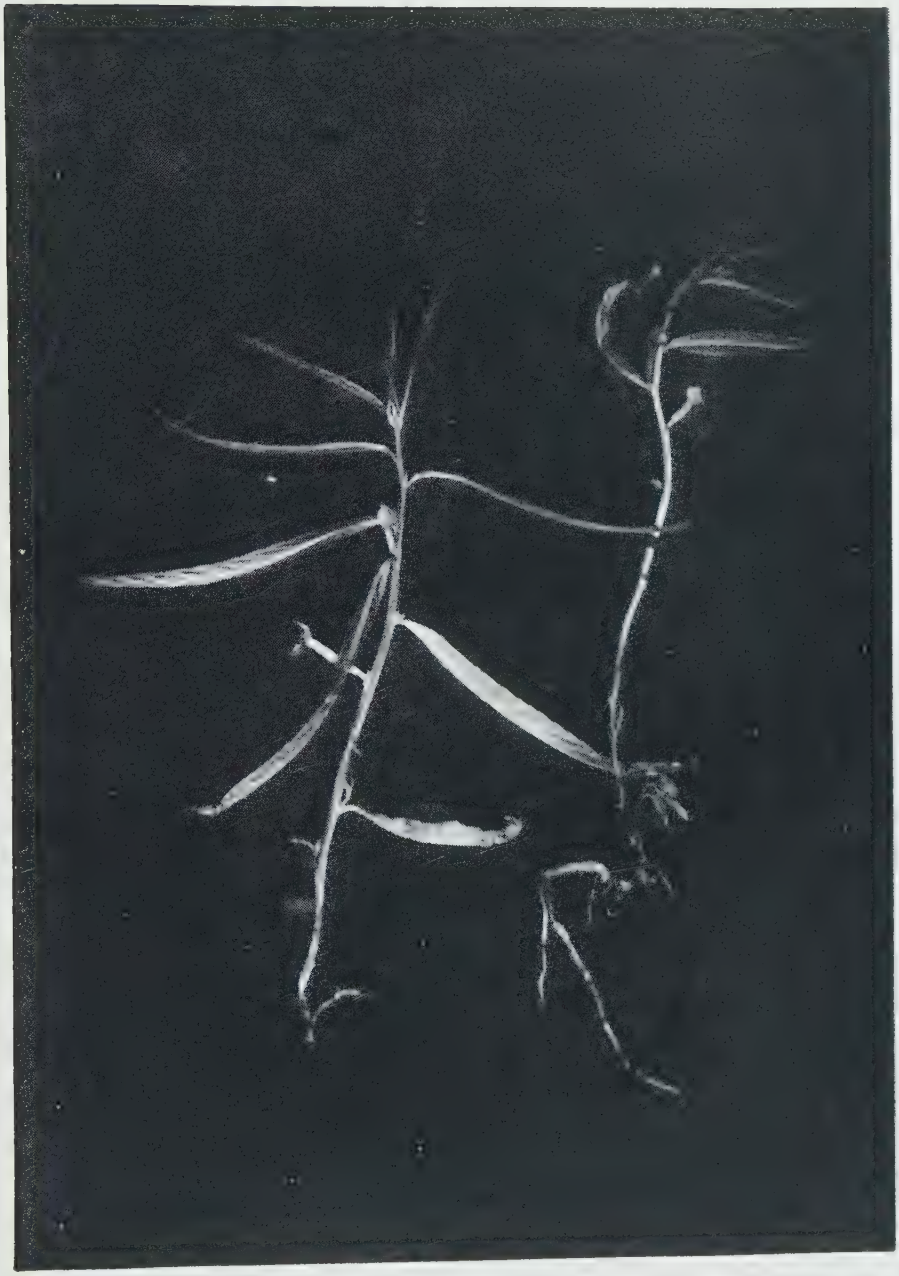


Fig. 10

Fig. 11

Vol. 26 — Artigo 10 Dezembro de 1959

COMBATE À MARIPOSA ORIENTAL DAS FRUTAS *GRAPHOLITHA MOLESTA* (BUSCK) EM MARMELEIROS(*)

POR

O. Falanghe, N. Dias Netto e J. B. Molinari Araújo

Do Instituto Biológico de São Paulo

Com 5 tabelas no texto

Em 1943, LEPAGE (*8*) chamava a atenção para uma ameaça à fruticultura paulista, representada por duas importantes pragas da macieira e outras rosáceas frutíferas, cujas primeiras constatações no Brasil haviam sido feitas no Rio Grande do Sul. As pragas referidas eram a *Carpocapsa pomonella* L. e a *Grapholitha molesta* BUSCK que, provenientes da Argentina, haviam se introduzido no Sul do país, através do Uruguai.

Pouco depois dessa advertência, uma das pragas, a *G. molesta,* foi constatada na capital paulista e em outras zonas frutícolas do Estado, atacando pessegueiros.

A partir dessas primeiras verificações, o Instituto Biológico comunicou o fato às autoridades fitossanitárias federais e promoveu um levantamento das zonas infestadas, assinalando sua presença nas seguintes localidades: São José do Rio Pardo, Pindamonhangaba, Taubaté, Caçapava, Tremembé, Aparecida, Guaratinguetá, Itu, Joanópolis, Pedreira, Piracaia, Bragança Paulista, Atibaia, Indaiatuba, Amparo, Socorro, São Paulo e São Roque (*9*).

Apesar da maioria dessas primeiras verificações se referirem a infestações em pessegueiros, verificou-se também, em alguns casos, a incidência de *G. molesta* em marmeleiros. Observações mais minuciosas feitas posteriormente confirmaram ser a *G. molesta* seríssima praga de tôdas as rosáceas frutíferas cultivadas entre nós, principalmente do pessegueiro, marmeleiro, pereira, macieira e amexeira.

Vulgarmente denominada por "mariposa oriental das frutas", a *G. molesta* é originária do continente asiático, provàvelmente do Japão, de onde se disseminou para todos os países que cultivam rosáceas frutíferas, sendo encontrada ainda, no Canadá, Austrália, China, Coréia, Mandchúria, França, Itália, Argentina, Uruguai e Brasil. Atualmente, o índice de infestação no Estado de São Paulo atinge níveis muito elevados, mòrmente em pessegueiros e marmeleiros.

(*) Recebido para publicação em 5 de outubro de 1959.

Em marmeleiros, os danos causados pela *G. molesta* são devidos ao hábito da larva broquear os ramos novos e principalmente os frutos. Como conseqüência do ataque das lagartas, os brotos são perfurados na região apical, começam a murchar progressivamente da extremidade para a base e acabam secando na região afetada; os frutos sofrem destruição parcial ou total da polpa, chegando muitas vêzes ao apodrecimento pela subseqüente invasão de microrganismos. As lagartas podem ainda atacar flôres e botões florais, provocando lesões que culminam com o "shedding" dos mesmos. Os adultos não são nocivos às plantas.

Entre nós, o início do ataque em marmeleiros verifica-se em meados de agôsto, destruindo nessa época grande parte dos brotos surgidos após a poda. Considerando as falhas ocasionadas na formação dos primeiros ramos frutíferos, pode-se avaliar a extensão dos prejuízos na produtividade. A incidência da praga ainda se manifesta com relativa intensidade nos botões e nas flôres, para agravar-se consideràvelmente a partir da produção dos frutos.

Os primeiros estudos realizados pelo Instituto Biológico, visando o combate químico à *G. molesta,* datam da ocasião de sua introdução em nosso Estado. Pela falta de melhores inseticidas, muito pouco, ou quase nada, se conseguiu de prático na oportunidade.

Com o advento dos modernos inseticidas orgânicos de contacto, os técnicos da Secção de Entomologia Agrícola reiniciaram os experimentos de combate à *G. molesta,* estabelecendo nos marmelais da Fazenda Experimental "Mato Dentro", em Campinas, a partir de 1952, uma série de ensaios para testar a eficiência dos mais promissores produtos até então formulados. Os resultados conseguidos, muito embora superassem os obtidos anteriormente, estavam ainda longe de satisfazer sob o ponto de vista técnico e econômico. Dos inseticidas ensaiados, o DDT com 1% de princípio ativo foi o que melhores resultados proporcionou, sem conseguir entretanto, em alguns casos, evitar uma elevada porcentagem de ataque.

Estudos da biologia e hábitos da praga, concluídos posteriormente, esclareceram as causas determinantes da baixa efetividade dos inseticidas experimentados. Constatou-se que os tratamentos químicos estavam sendo iniciados tardiamente, quando os frutos já se apresentavam com cêrca de 1,5 cm de diâmetro, portanto em condições de abrigarem lagartas em seu interior, protegidas contra a ação dos inseticidas. Mediante estudo comparativo entre o tratamento iniciado após a formação dos frutos e o iniciado por ocasião da florada, constatou-se a indiscutível vantagem desta última prática na debelação da praga.

Tendo em vista a crescente importância que a exploração comercial das rosáceas frutíferas vêm adquirindo em nosso Estado, e considerando a necessidade de novas experimentações de combate químico a partir de tratamentos, bem antecipados em relação à época de frutificação, os autores estabeleceram um plano de trabalho fundamentalmente diferente dos anteriores quanto à época do início dos tratamentos, programando a primeira aplicação logo que se constatassem ataques aos brotos surgidos após a poda, antes do aparecimento das flôres e frutos, e cujos resultados aqui aparecem.

MATERIAIS E MÉTODOS

O ensaio foi instalado na Fazenda Experimental "Mato Dentro", em Campinas, em agôsto de 1958, em cultura de marmelo da variedade Portugal, com aproximadamente vinte anos de idade, sujeita a fortes infestações anuais de *G. molesta*. O ensaio utilizou 60 plantas, e o delineamento estatístico adotado foi o de "blocos ao acaso", no qual, seis tratamentos foram repetidos cinco vêzes; cada parcela contou com duas plantas, tendo-se deixado plantas de barreira tanto dentro dos blocos como entre êles.

Foram experimentados os seguintes tratamentos (concentrações expressas em porcentagem de princípio ativo):

A — DDT a 1%
B — Malathion a 0,2%
C — Endrin a 0,06%
D — Lindane a 0,04%
E — Toxafeno a 0,3%
F — Testemunha

Todos os inseticidas foram aplicados sob a forma de pulverização normal, isto é, a alto volume. Com exceção do DDT a 1%, preparado a partir de pó molhável a 50%, os demais produtos foram preparados com concentrados emulsionáveis comerciais.

Durante o período da florada os tratamentos foram repetidos a cada 10 dias; após êsse período foi dado o intervalo de 15 dias entre as aplicações. Assim, entre 13 de agôsto e 5 dezembro, datas respectivas da primeira e última aplicação, foi realizado um total de dez tratamentos.

A fim de evitar prejuízos à cultura com a possível incidência de entomosporiose procedeu-se ao tratamento quinzenal de tôda a cultura com calda bordalesa a 1%, exceção feita ao período da flo-

rada, no qual utilizou-se calda a 0,5%, para evitar danos às flôres e botões. Normalmente os tratamentos com fungicidas foram realizados no período da manhã, deixando-se para a tarde os tratamentos com inseticidas. Tal procedimento justificou-se em face de certa incompatibilidade entre a calda bordalesa e alguns dos inseticidas experimentados.

A colheita foi efetuada em 8 de janeiro de 1959; procedeu-se a separação e a contagem dos frutos sadios e atacados e, a seguir, a pesagem de cada grupo.

A análise estatística dos resultados, tanto em relação ao número como ao pêso dos frutos atacados, processou-se pela transformação dos dados iniciais em valores correspondentes a porcentagens dos totais. Êstes por sua vez, foram transformados, arco seno $\sqrt{\text{porcentagem de ataque}}$ (2). A apreciação estatística do ensaio foi feita através da análise da variância; na comparação das médias, utilizou-se o teste de Tukey para os níveis fiduciais de 1% e 5%.

RESULTADOS

No decorrer do experimento as plantas apresentaram infestação satisfatória, como foi dado observar pela incidência ocorrida nas testemunhas, que correspondeu à infestação média em marmeleiros nestes últimos anos. As aplicações de inseticidas não foram prejudicadas por fatores climáticos normais da época, especialmente por chuvas, pois não ocorreram precipitações logo após os tratamentos. Tendo sido constatado, após as primeiras aplicações, que o toxafeno prejudicava as plantas, queimando fôlhas e flôres, decidiu-se eliminar êste tratamento do ensaio; e na análise estatística dos resultados não se levou em consideração os dados obtidos nestas parcelas.

Os resultados conseguidos com relação ao número de frutos atacados e sadios estão expressos na tabela I, onde o efeito prejudicial do toxafeno ao marmeleiro pode ser fàcilmente percebido pela substancial redução de frutos colhidos. Enquanto as parcelas dos demais tratamentos produziram em média 700 frutos, as que receberam aplicações de toxafeno a 0,3%, no início do experimento, forneceram apenas 44 frutos, pois o tóxico danificou a quase totalidade das flôres e frutos primeiramente produzidos.

Constata-se que o total de frutos produzidos nas parcelas dos diversos tratamentos não foi muito uniforme: enquanto as testemunhas e as parcelas tratadas com malathion chegaram a produzir mais de 900 frutos, as que se submeteram a aplicações com os inseticidas mais eficientes (DDT e endrin) deram apenas cêrca de 600

TABELA I

Resultado da colheita do ensaio de combate à *Grapholitha molesta,* em número de frutos.

TRATAMENTOS	Número de frutos colhidos nas diversas repetições										TOTAL DE FRUTOS		
	ATACADOS					SADIOS							
	1.ª R	2.ª R	3.ª R	4.ª R	5.ª R	1.ª R	2.ª R	3.ª R	4.ª R	5.ª R	Atacados	Sadios	Colhidos
DDT a 1%	28	9	10	3	5	331	32	110	16	37	55	526	581
MALATHION a 0,2%	281	143	129	59	58	158	34	44	15	8	670	259	929
ENDRIN a 0,06% ..	187	123	73	24	10	110	45	20	6	6	417	187	604
LINDANE a 0,04% ..	91	94	201	38	27	2	9	26	2	1	451	40	491
TOXAFENO a 0,3% .	0	6	13	1	1	0	10	13	0	0	21	23	44
TESTEMUNHA	40	191	435	98	26	6	24	69	14	0	790	113	903

TABELA II

Resultado da colheita do ensaio de combate à *Grapholitha molesta*, em pêso de frutos.

TRATAMENTOS	Pêso em kg dos frutos colhidos nas diversas repetições										Pêso total dos frutos em kg		
	ATACADOS					SADÍOS							
	1.ª R	2.ª R	3.ª R	4.ª R	5.ª R	1.ª R	2.ª R	3.ª R	4.ª R	5.ª R	Atacados	Sadíos	Colhidos
DDT a 1%	5,800	2,400	1,300	0,700	1,200	42,100	5,500	22,000	2,900	5,700	11,400	78,200	89,600
MALATHION a 0,2%	32,100	22,200	19,040	8,900	8,000	21,400	5,800	10,200	2,700	1,100	90,240	41,200	132,440
ENDRIN a 0,06% ..	19,600	16,400	11,050	2,800	2,000	18,000	10,140	3,100	1,300	1,200	51,850	33,740	84,590
LINDANE a 0,04% ..	9,020	10,100	24,100	6,800	5,200	0,420	1,420	4,200	0,380	0,230	55,220	6,650	61,870
TOXAFENO a 0,3% .	0,000	0,800	2,100	0,200	0,120	0,000	1,400	1,050	0,000	0,000	3,220	2,450	5,670
TESTEMUNHA	5,100	23,100	40,400	11,020	3,270	0,840	2,860	4,910	2,600	0,000	82,890	11,210	94,100

TABELA III

Resultado das porcentagens de ataque e das reduções de infestações obtidas no ensaio de combate à *Grapholitha molesta*.

TRATAMENTOS	N.º de frutos				Pêso de frutos em kg			
	Total	Atacados	Porcentagem de ataque	Redução do ataque em % (*)	Total	Atacados	Porcentagem de ataque	Redução do ataque em % (*)
DDT a 1%	581	55	9,47	89,18	89,60	11,40	12,72	85,56
MALATHION a 0,2% .	929	670	72,12	17,57	132,44	90,24	68,14	22,65
ENDRIN a 0,06%	604	417	69,04	21,09	84,59	51,85	61,30	30,41
LINDANE a 0,04% ...	491	451	91,85	—	61,87	55,22	89,25	—
TESTEMUNHA	903	790	87,49	—	94,10	82,89	88,09	—

(*) Porcentagem de redução em relação ao testemunha, calculada pelo método de Abbott (*1*).

TABELA IV

Resultado da transformação dos dados do número de frutos atacados em arco seno $\sqrt{\text{porcentagem de frutos atacados}}$ no ensaio de combate à *Grapholitha molesta*.

TRATAMENTOS	Repetições					Totais	Médias
	1	2	3	4	5		
DDT a 1%	16,22	27,97	16,74	23,42	20,18	104,53	20,91
MALATHION a 0,2%	53,13	64,01	59,74	63,22	69,64	309,74	61,95
ENDRIN a 0,06%	52,53	58,82	62,37	63,44	52,24	289,40	57,88
LINDANE a 0,04%	81,47	72,84	70,18	77,08	79,06	380,63	76,13
TESTEMUNHA	68,87	70,45	68,28	69,30	90,00	366,90	73,38
TOTAIS	272,22	294,09	277,31	296,46	311,12	1451,20	—

Diferença mínima significativa (Tukey) ..... 5% — 11,78
1% — 14,93

TABELA V

Resultado da transformação dos dados do pêso de frutos atacados em arco seno $\sqrt{\text{porcentagem do pêso de frutos atacados}}$ do ensaio de combate à *Grapholitha molesta*.

TRATAMENTOS	Repetições					Totais	Médias
	1	2	3	4	5		
DDT a 1%	20,36	33,46	13,69	26,13	24,65	118,29	23,66
MALATHION a 0,2%	50,13	62,94	53,79	61,14	69,64	297,64	59,53
ENDRIN a 0,06%	46,20	51,83	66,42	55,73	52,24	272,42	54,48
LINDANE a 0,04%	77,89	69,47	67,37	76,69	78,17	369,59	73,92
TESTEMUNHA	67,94	70,63	70,81	64,08	90,00	363,46	72,69
TOTAIS	262,52	288,33	272,08	283,77	314,70	1421,40	—

Diferença mínima significativa (Tukey) ..... 5% — 14,29
1% — 18,12

frutos. Tal ocorrência pode ser explicada pelo fato de existirem no campo plantas de portes desiguais e pela coincidência do sorteio ter determinado que certos tratamentos abrangessem maior número de plantas menos desenvolvidas.

A tabela II reune os dados da colheita de marmelo, relativos ao pêso dos frutos atacados e sadios das diversas parcelas do ensaio. Constata-se também, sob êste aspecto, a insignificante produção das parcelas tratadas com toxafeno e, de modo menos marcante, a falta de uniformidade nas produções das parcelas submetidas a pulverizações com os demais inseticidas.

Melhor se estima o valor dos diversos tratamentos pela análise dos dados contidos na tabela III. Com relação ao número de frutos, observa-se que os tratamentos com DDT a 1% sòmente não protegeram 9,47% dos frutos produzidos, enquanto 87,49% dos frutos produzidos pelas testemunhas estavam atacados pelo inseto. Com isso, o DDT destacou-se bastante de todos os outros inseticidas e conseguiu uma apreciável redução de ataque, cêrca de 89,19%, altamente expressivo para uma praga com as características da *G. molesta*. Situam-se em seguida, os resultados obtidos com o endrin e o malathion, porém, com níveis bastante inferiores pois as reduções do ataque foram, respectivamente, de 21,09 e 17,57%.

Considerando-se os resultados expressos em pêso de frutos, também registrados na tabela III, idênticas considerações podem ser feitas. O DDT aplicado na concentração de 1% só não conseguiu proteger 12,7% em pêso dos frutos, enquanto os outros inseticidas não preservaram da praga mais de 60% em pêso dos mesmos, tendo sido assegurada uma redução de ataque superior a 85% em pêso em comparação com a Testemunha.

Nas tabelas IV e V são apresentados os resultados da transformação dos dados em número de frutos atacados e em pêso de frutos atacados em ângulos, segundo a fórmula de Bliss, bem como as diferenças mínimas significativas aos níveis fiduciais de 5 e 1% conseguidas da análise estatística dos dados.

A análise estatística do ensaio, tanto com relação ao número de frutos como em relação ao pêso dos mesmos, conduz a idênticas considerações, que podem ser assim expostas:

1 — Os tratamentos com DDT a 1% e Endrin a 0,06% foram altamente significantes em relação à Testemunha.

2 — O tratamento com Malathion a 0,2% não diferiu estatìsticamente da Testemunha.

3 — O tratamento com Lindane a 0,04% inexplicàvelmente apresentou resultados inferiores aos da Testemunha.

4 — O confronto entre os resultados dos diversos produtos revela que o tratamento com DDT a 1% foi altamente significativo quando relacionado com o Endrin a 0,06% e com o Malathion a 0,2%, mas que o tratamento com Endrin a 0,06% não chegou a diferir estatìsticamente do Malathion a 0,2%.

CONCLUSÕES

Baseando-se nos resultados do presente estudo e em dados conseguidos em pesquisas anteriores, as conclusões relativas ao combate à. *G. molesta* em marmeleiros podem ser assim sumariadas:

1 — Dos inseticidas experimentados, o DDT — aplicado sob a forma de pulverizações na concentração de 1% de princípio ativo — apresentou os melhores resultados, sobressaindo-se bastante entre os demais.

2 — Com bases na redução média da praga, conseguida mediante pulverizações com DDT a 1%, conclui-se pela ampla e satisfatória possibilidade de proteção dos marmelais ao ataque de *G. molesta* ùnicamente pelos tratamentos químicos.

3 — A fim de conseguir o máximo de proteção aos marmelais, o início dos tratamentos deve coincidir com o comêço da brotação, assegurando o desenvolvimento normal de todos os ramos frutíferos.

4 — Durante os períodos de vegetação e frutificação há necessidade de serem realizados, no mínimo, oito tratamentos, a intervalos variáveis de 10 a 15 dias, em concordância com o desenvolvimento das plantas.

AGRADECIMENTOS

Aqui ficam expressos os agradecimentos dos autores ao Dr. A. Conagin, pela colaboração prestada no planejamento e análise estatística do presente estudo; ao Dr. G. Calcagnolo, pelas sugestões na apresentação dêste trabalho, e ao Sr. Armênio C. Soares pela colaboração na execução do presente ensaio.

CONTROL OF *GRAPHOLITHA MOLESTA* (BUSCK) ON QUINCE

Abstract

According to the results presented in this paper and to the data obtained in previous research, on the control of G. molesta on Quince, the conclusions can be summarized as follows:

1 — Best result was obtained by spraying DDT at the concentration of 1% of active substance, which was outstandingly more efficient than the other tested products.

2 — Based on the average redution of the pest, obtained by spraying DDT at 1%, the conclusion is that Quince plantations can be satisfactorily protected against G. molesta with the exclusive use of chemical treatments.

3 — To obtain better protection of the culture, treatments should be started at the beginning of he new flush of growth, thus permitting the normal development of fruiting branches.

4 — During the periods of vegetation and fructification it is necessary to apply the treatment at least eight times at intervals of 10 to 15 days, depending on the development of the trees.

BIBLIOGRAFIA

1 — ABBOTT, W. S. — 1925 — A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. econ. Ent.* **18** (2): 265-267.

2 — BLISS, C. I. — 1937 — *Pl. protection Leningrado.* 12: 67-77.

3 — BOBB, M. L. — 1953 — The Oriental Fruit Moth and its control in Virginia. *Agric. Exp. Station.* Blacksburg, Va., *Bull.*, 457, 11 pp.

4 — CONAGIN, A. — 1957 — Princípios de Técnica Experimental e Análise Estatística de Experimentos. Instituto Agronômico de Campinas. 122 pp. (Mimiografado).

5 — DANIEL, D. M., J. COX & A. CRAWFORD — 1933 — Biological control of the oriental fruit moth. New York State Agric. Exp. Stat., Geneva, N. Y., Bull. 635, 27 pp.

6 — DANIEL, D. M. & J. A. COX — 1936 — Oriental fruit moth control in quince plantings. New York State Agric. Exp. Station, Geneva, N. Y., Bull. 669, 16 pp.

7 — GIANNOTTI, O. & H. S. LEPAGE — 1951 — Nota preliminar sôbre o efeito de alguns inseticidas modernos sôbre duas pragas do pessegueiro (*Ceratitis capitata* e *Grapholita molesta*). *Biológico*, **17** (9): 166-168.

8 — Lepage, H. S. — 1943 — Uma ameaça para a fruticultura paulista. *Biológico* 9 (8): 195-200.

9 — Lepage, H. S. & M. Fadigas Jr. — 1944 — A Mariposa oriental das frutas — *Grapholita molesta* (Busck) — *Biológico* 10 (5): 135-140.

10 — Lima, A. da C. — 1945 — Insetos do Brasil — 5.º tomo Lepidópteros (1.ª parte) pp. 340-346.

11 — Lima, A. D. F. — 1950 — Combate à mariposa oriental do pessegueiro. Comun. 92, Serv. Inf. Agric. do Min. da Agricultura.

12 — Mariconi, F. A. M. — 1958 — Inseticidas e seu emprêgo no combate às pragas. Edit. Agron. "Ceres" Ltda., São Paulo, 532 pp.

13 — McCampbell, S. C. & J. H. Newton — 1944 — Oriental Fruit Moth. Colorado State College, Col., Bull. D-49, 16 pp.

14 — Neiswander, R. B. — 1936 — Oriental Fruit Moth Investigations in Ohio. II. Ohio Agric. Exp. Station. Wooster, Ohio, Bull., 569, 30 pp.

15 — Smith, L. M. & F. M. Summers — 1948 — Propagation of the oriental fruit moth under central California conditions. *Hilgardia,* 18 (10): 369-387.

16 — Wingo, C. W. — 1941 — The Oriental Fruit Moth in Missouri. Agric. Exp. Station. Columbia, Mo., Bull. 424, 14 pp.

Vol. 26 — Artigo 11 Dezembro de 1959

SÍNTESE DA RIBOFLAVINA POR *BACILLUS COAGULANS* E *B. SUBTILIS*

EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DE SUSPENSÕES DÊSSES MICRORGANISMOS, POR VIA ORAL, A RATOS EM CARÊNCIA EXPERIMENTAL(*)

POR

V. O. Guida & J. P. Forster

Do Instituto Biológico de São Paulo

Com 1 gráfico no texto

Tem sido demonstrado inúmeras vêzes (*1, 2, 3, 4, 7, 8*), que certas bactérias têm a capacidade de sintetizar vitaminas do grupo B. Rogers (*10*) mostrou também que a riboflavina pode ser sintetizada por bactérias e Princivalle & Lorch (*9*) verificaram que essa vitamina é elaborada por *Bacillus subtilis, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus lactis* e *Streptococcus lactis.*

Em trabalho anterior (*5*), quando administramos diàriamente uma suspensão de esporos do *B. polymyxa,* associada a um gama de riboflavina, por via oral, a ratos em carência experimental, os animais apresentaram um sensível aumento de pêso e 100% de sobrevida. A mesma suspensão de esporos, ou 1 μg de riboflavina por dia, dados isoladamente, eram incapazes de acelerar o crescimento, de impedir o aparecimento dos sintomas da avitaminose ou mesmo a morte dos animais.

No presente trabalho foram experimentadas, do mesmo modo, suspensões do *B. coagulans* e *B. subtilis,* por via oral, em ratos em carência de riboflavina, para verificar se êstes germes também sintetizam essa vitamina.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram empregadas, nêste trabalho, amostras de *B. coagulans* e *B. subtilis,* isoladas do solo e identificadas por nós. Com êstes microrganismos foram preparadas, após várias lavagens, com água fisiológica, suspensões que continham um milhão de esporos por ml.

Os ratos utilizados neste estudo, originalmente Wistar, pertenciam à criação do Instituto Biológico; eram do sexo masculino, em idênticas condições de saúde e pêso (cêrca de 40 g de pêso e 30 dias de idade).

A fim de evitar o fenômeno de refecação, os animais foram colocados em gaiolas individuais anticoprofágicas, com piso de arame,

com aberturas de 8 mm de diâmetro. A temperatura da sala era de cêrca de 25º C. A dieta administrada para provocar a avitaminose experimental foi descrita no trabalho anterior (*5*).

Durante 7 dias os ratos utilizados nesta experiência foram submetidos a uma depleção da vitamina B_2, recebendo, porém, além da ração, um suplemento contendo tôdas as vitaminas menos a riboflavina. Em seguida, foram divididos em seis grupos de 10 animais cada um, de acôrdo com o seguinte esquema:

GRUPO I — Além da dieta do grupo VI, recebeu também um suplemento diário de 1 μg de riboflavina e 0,5 ml da suspensão de esporos de *B. coagulans.*

GRUPO II — Recebeu a mesma dieta do grupo VI e um suplemento diário de 1 μg de riboflavina e 0,5 ml da suspensão de esporos de *B. subtilis.*

GRUPO III — Recebeu a mesma dieta do grupo VI e mais 0,5 ml da suspensão de esporos de *B. coagulans,* diàriamente.

GRUPO IV — Recebeu a mesma dieta do grupo VI e mais 0,5 ml da suspensão de esporos de *B. subtilis,* diàriamente.

GRUPO V — Recebeu o mesmo alimento do grupo VI e 1 μg de riboflavina por dia, por via oral.

GRUPO VI — Considerado como testemunha, continuou recebendo, após o período de depleção da riboflavina, ùnicamente a dieta, isenta de riboflavina.

Os animais foram observados durante 8 semanas, anotando-se os sintomas de avitaminose que ocorreram no decurso da experiência, devido à ausência da riboflavina nas dietas (parada de crescimento, catarata, alopécia e morte).

RESULTADOS

Os resultados obtidos são mostrados na Figura 1.

No grupo VI, que recebeu a dieta sem riboflavina, morreram todos os animais com sintomas típicos de avitaminose B_2.

O grupo V, tratado com 1 μg de riboflavina por dia, no fim da oitava semana, apresentou a média de ganho de pêso de 19 g, com sintomas de avitaminose menos acentuados do que o grupo anterior.

(*) Recebido para publicação em 27 de outubro de 1959.

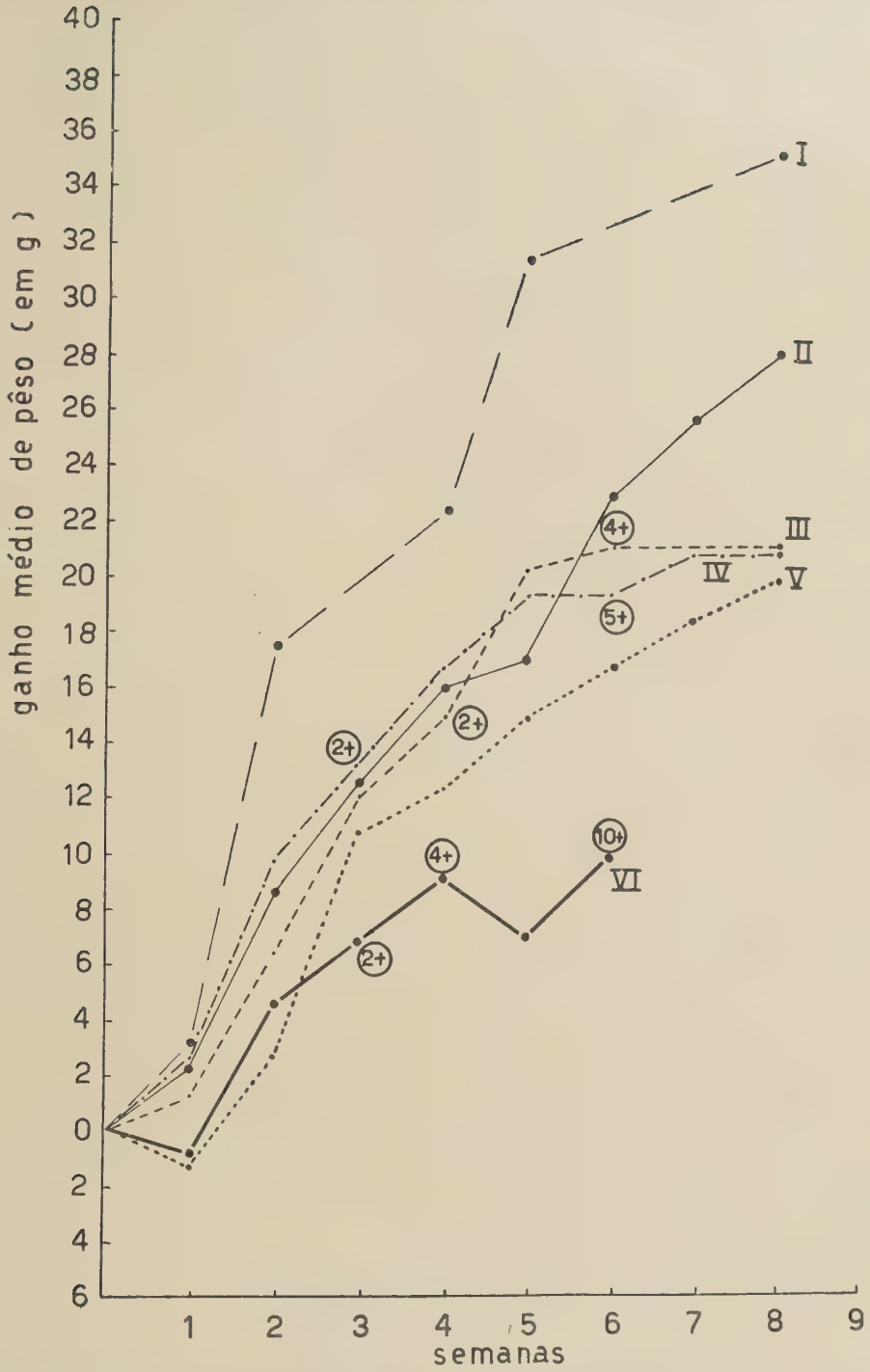


Fig. 1 — Influência da administração de esporos de *Bacillus coagulans* e de *B. subtilis*, por via oral, na sobrevida e ganho de pêso de ratos, que receberam uma dieta isenta ou de baixo teor de riboflavina.

\+ = n.º total de ratos mortos.
I = esporos de *B. coagulans* + 1 μg de riboblavina.
II = esporos de *B. subtilis* + 1 μg de riboflavina.
III = esporos de *B. coagulans*.
IV = esporos de *B. subtilis*.
V = 1 μg de riboflavina.
VI = Dieta sem riboflavina.

O grupo IV, que recebeu além da dieta isenta de riboflavina, uma suspensão de esporos de *B. subtilis,* apresentou, além dos sintomas de avitaminose idênticos ao grupo anterior, a ocorrência de 70% de mortes.

No grupo III, que recebeu a suspensão de esporos de *B. coagulans,* a ocorrência de mortes atingiu a 60%, havendo os ratos remanescentes apresentado um ganho de pêso de 20 g até o fim da experiência.

Finalmente, nos grupos I e II, que receberam respectivamente, além de 1 μg riboflavina, as suspensões de esporos de *B. coagulans* e de *B. subtilis,* não houve ocorrência de mortes, nem sintomas de avitaminose. O primeiro grupo atingiu a média de ganho de pêso de 36 g, enquanto que no segundo grupo a média foi de 28 g.

DISCUSSÃO

Êstes resultados mostram que a administração diária de uma associação das suspensões de esporos de *B. coagulans* ou *B. subtilis,* com 1 μg de riboflavina é capaz de prevenir o aparecimento da avitaminose B_2. Comparando êstes resultados com os obtidos nos grupos que receberam êstes tratamentos isoladamente, vamos verificar que a administração de 1 μg de riboflavina ou da suspensão de esporos diàriamente é incapaz de impedir o aparecimento dos sintomas de avitaminose, ou mesmo a morte dos animais.

Êstes resultados são semelhantes aos obtidos em trabalho anterior (*5*), onde administramos suspensões de esporos de *B. polymyxa* a ratos, com ou sem adição de riboflavina. Nêsse trabalho, assinalámos as várias hipóteses que poderiam ser formuladas para explicar a ação dêsses germes no tubo digestivo dos ratos. Julgamos que também para o caso do *B. coagulans* e *B. subtilis* cabem essas mesmas hipóteses.

RESUMO E CONCLUSÃO

Suspensões de esporos de *B. coagulans* e de *B. subtilis* associadas a 1 μg de riboflavina, administradas diàriamente, por via oral, a ratos em dieta carente de riboflavina, previnem a avitaminose B_2. Administradas as suspensões de esporos ou a riboflavina — 1 μg por dia —, isoladamente, falham em impedir o aparecimento dos sintomas e a morte dos animais.

STUDIES ON THE RIBOFLAVIN SYNTHESIS BY *B. COAGULANS* AND *B. SUBTILIS*

EFFECTS OF ADMINISTRATION OF SUSPENSION OF THESE MICROORGANISMS, BY ORAL ROUTE, TO RATS SUBJECTED TO EXPERIMENTAL AVITAMINOSIS

Abstract

The daily administration of 0.5 ml of B. coagulans or B. subtilis spore suspension, associated with 1 μg of riboflavin, to young rats fed with a riboflavin-free basal ration, produced a weight gain of 36 g and 28 g respectively, in 8 weeks, and prevented clinical manifestation of vitamin deficiency.

The daily administration of 1 μg of riboflavin or 0.5 ml of a suspension of spores of B. coagulans or B. subtilis to other rat groups produced a weight gain of only 20 g, in 8 weeks, and do not prevented the symptoms of avitaminosis and the death of some animals.

The rats of the control group (riboflavin-free basal ration) died within six weeks (100%), showing alopecy due to this avitaminosis.

BIBLIOGRÁFIA

1 — Burkholder, P. R. & Mac Veight, I. — 1942 — Synthesis of vitamins by intestinal bacteria. *Proc. Nat. Acad. Sci., Wash.*, **28**: 258-289.

2 — Guida, V. O., Faria, A. L. & Forster, J. P. — 1958 — Microrganismos saprófitas como fonte de vitaminas. Síntese de vitaminas B_1, B_{12} e ácido nicotínico por bactérias esporuladas aeróbias. *Rev. Bras. Gastroent.*, **10** (3): 137-144.

3 — Guida, V. O. & Corrêa, R. — 1957 — Determinação do teor de vitamina B_{12} existente no corpo celular e nos filtrados de cultura de bactérias esporuladas aeróbias. *An. Farm. e Química*, São Paulo, **8** (7-8): 6-12.

4 — Guida, V. O. & Forster, J. P. — 1957 — Síntese de tiamina por bactérias saprófitas no tracto intestinal de ratos. *Rev. Bras. Gastroent.*, **9** (4): 1691182.

5 — Guida, V. O. & Forster, J. P. — 1958 — Síntese da riboflavina por *B. polymyxa*. *Arq. Inst. Biol.*, S. Paulo, 25 (9): 77-82.

6 — Guha, B. C. — The synthesis of vitamin B_1 and Bios by *B. vulgaris*. *Ind. J. Med. Res.*, **19**: 977-983.

7 — Landy, M., Sarkum, N. W. & Oswald, E. J. — 1943 — Bacterial synthesis of p-amino-benzoic acid. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, **52**: 338-341.

8 — Landy, M. & Dickens, D. M. — 1941 — Biotin synthesis by microorganisms. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, **46**: 1086-1092.

9 — Princivalle, M. & Lorch, von L. — 1958 — Sintesi di alcune vitamine del gruppo B da parte di ceppi artificialmente resi antibiotico-resistenti. *Rend. Inst. Super. di Sanitá*, **21** (IV-V) : 437-442.

10 — Rogers, N. E. — 1942 — The synthesis of riboflavin by microorganisms. Ph. D. Thesis, University of Wisconsin.

11 — Roger y Stamer, Dondoroff, M. & Delberg, E. A. — 1957 — The Microbial World, Prentice-Hall, Inc., N. J., U. S. A.

Vol. 26 — Artigo 12 Dezembro de 1959

PESQUISA DE AGLUTININAS ANTI-LEPTOSPIRA NO SÔRO DE BOVINOS DO ESTADO DE SÃO PAULO(*)

POR

V. O. Guida
C. A. Santa Rosa
Do Instituto Biológico de São Paulo

M. D'Apice
Da Faculdade de Med. Vet. de S. Paulo

M. O. Corrêa
V. Natale
Do Instituto Adolfo Lutz

Com uma tabela no texto

Bastante recente é a noção de que os bovídeos são acometidos com freqüência por leptospiroses, conforme demonstraram as pesquisas fundamentais dos autores russos e israelitas. Bem se avalia da importância de seu estudo quando se recorda que a leptospirose é a quarta mais importante doença do gado nos E. U. A. e é responsável pelo prejuízo anual de cem milhões de dólares que inflige à comunidade rural.

A identificação da *L. grippotyphosa* como o agente etiológico das epizootias do gado na U. R. S. S. coube a Michin & Azinov (*11*), e a Nikolajeff (*12*) a primazia da descoberta da etiologia leptospirótica de tais afecções. Na mesma ocasião a moléstia foi intensivamente investigada em Israel por Bernkopf (*3*) (1946) que a atribuiu a um novo serotipo para a qual Btesh (*4*) (1947) sugeriu o nome de *L. bovis*. Atualmente é sabido que *L. bovis* passou à sinonímia da *L. grippotyphosa*.

Nos E. U. A., Gochenour, Yager & Wetmore (*7*) (1950) identificaram como *L. pomona* as amostras isoladas do gado por Baker & Little (*2*) (1948) e por Little & col. (*9*) (1950). Na Austrália e Nova-Zelândia (*15*) o agente etiológico que prepondera nas leptospiroses bovinas é ainda a *L. pomona*, que desencadeia o chamado "red-water" dos bezerros.

Em Israel, Van der Hoeden (*8*) (1951) descreveu epizootias e casos esporádicos de leptospiroses bovinas causadas pela *L. canicola;* na Argentina, Maria & Quevedo (*10*) (1947) relataram casos de leptospirose de bezerros provocados pela *L. icterohaemorrhagiae*. Posteriormente o mesmo fizeram Field & Sellers (*5*) (1950) na Inglaterra.

No decurso de uma enzootia de leptospirose em bovinos, no Japão, com 30% de mortalidade, Yamamoto (*17*) (1951) verificou no

(*) Recebido para publicação em 26 de novembro de 1959.

sôro dêsses animais aglutininas para *L. australis* A., *L. automnalis* e *L. hebdomadis*. Na África Central, VAN RIEL (*13*) (1948) encontrou sôro-aglutinações positivas para *L. australis* A., *L. bataviae*, L. *grippotyphosa, L. pomona, L. hebdomadis, L. icterohaemorrhagiae;* SAVINO & RENNELLA (*14*) encontraram 20% de reações positivas para *L. hyos* nos animais examinados na Argentina.

Em suma, a exemplo do que ocorre com a febre dos arrozais e com a meningite dos porqueiros, a leptospirose dos bovinos deve ser considerada como uma entidade sindrômica produzida por diversas leptospiras, das quais as principais são a *L. grippotyphosa* e a *L. pomona*. Aqui no Brasil, FREITAS & col. (*6*) descreveram o isolamento da *L. pomona* de bovinos.

No presente trabalho procedemos a um inquérito sorológico em 763 bovinos, procedentes de várias regiões do Estado de São Paulo, pesquisando aglutininas no sôro sanguíneo dêsses animais.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado com material colhido de 763 vacas, de rebanhos localizados em várias zonas do Estado, onde a ocorrência de abortos era freqüente e as provas sorológicas para brucelose, negativas.

Localidades onde os sôros foram colhidos:

Alvares Machado, Angatuba, Arujá, Bragança, Camanducaia, Campinas, Capital (Freguesia do Ó), Casa Branca, Cotia, Fernandópolis, Itapetininga, Itatiba, Jacareí, Jaguariuna, Martinópolis, Moji das Cruzes, Monte Mór, Pinhal, Piracicaba, Pirapora, Posse de Ressaca, Ribeirão Preto, São João da Bôa Vista, São José dos Campos, São Pedro.

Coleta e conservação dos sôros sanguíneos:

663 sôros sanguíneos foram colhidos em fazendas de criação, pelos veterinários da Secção de Assistência Veterinária do Instituto Biológico e gentilmente cedidos para o nosso trabalho.

100 sôros sanguíneos foram colhidos diretamente por nós, em rebanhos que apresentavam casos de abôrto e provas sorológicas negativas para brucelose. Os bovinos foram sangrados por punção da jugular, com agulhas 40 × 20, e o sangue colhido em recipientes estéreis com capacidade de 20 ml. O sangue assim obtido foi centrifugado e o sôro sanguíneo separado e conservado a 5º C.

Antígenos:

Como antígenos foram usadas culturas recentes de leptospiras, em meio de Korthof, submetidas à ação do formol. Foram empregadas as seguintes amostras: *Leptospira icterohemorrhagiae, L. canicola, L. bataviae, L. australis* B., *L. pomona, L. sejröe* e *L. grippotyphosa.*

Prova sorológica:

Para demonstrar a presença de aglutininas no sôro sanguíneo dos bovinos, foi utilizado o método de aglutinação-lise. O sôro sanguíneo foi diluido progressivamente e o antígeno acrescentado a essas diluições em partes iguais. Depois de 2 horas à temperatura de 37° C, as misturas foram examinadas em campo escuro, usando-se uma objetiva de aumento médio. Foram considerados apenas os títulos iguais ou superiores a 1:200.

Animais de laboratório usados no trabalho:

Cobaias albinas da criação do Instituto Biológico, com cêrca de 200 g de pêso; pintos de um dia da raça Leghorn.

Coleta de urina:

Para identificação de animais portadores de leptospira, a urina foi colhida diretamente da bexiga, e o líquido recolhido em frascos estéreis, para inoculação subseqüente dos animais de laboratório.

Foram inoculadas, no próprio estábulo, 130 cobaias, por via intraperitoneal, com 2 ml de urina, colhida das 57 vacas com títulos sorológicos positivos. Em alguns estábulos a operação foi repetida em diferentes ocasiões para confirmação do resultado. Inoculamos também 10 pintos de um dia, cada um com 0,5 ml de urina, por via intraperitoneal.

Coleta de sangue para inoculação de animais sensíveis:

Foram inoculadas 10 cobaias, por via intraperitoneal, com 2 ml de sangue, retirado assèpticamente da veia jugular, de vacas febris. Antes da inoculação o sangue foi desfibrinado também assèpticamente com o auxílio de pérolas de vidro.

Nos 10 dias seguintes à inoculação da urina e do sangue nas cobaias, registramos a temperatura retal de cada animal.

As cobaias foram sangradas por punção cardíaca e o sangue semeado em meio de Verwoort. Tôdas as culturas foram incubadas

a 28º C e examinadas no 10.º dia em campo escuro. De um feto abortado, no terceiro mês de gestação, foi inoculado o conteúdo estomacal em uma cobaia de 200 g, por via intraperitoneal. Fragmentos de fígado e rins, triturados com areia e água fisiológica estéreis, foram também inoculados, por via intraperitoneal, em cobaias novas. A temperatura retal das cobaias inoculadas foi também registrada nos 10 dias posteriores à inoculação.

RESULTADOS

Foram examinados 763 sôros de bovinos de várias localidades do Estado de São Paulo, para pesquisa de anticorpos anti-leptospira, pelo método de aglutinação-lise. Os antígenos foram preparados com amostras das seguintes espécies: *L. canicola, L. icterohemorrhagiae, L. bataviae, L. grippotyphosa, L. sejröe, L. pomona* e *L. australis* B.

Os resultados mostram, como podemos verificar na Tabela 1, uma predominância de reações positivas para a *L. icterohemorrhagiae* — 30 amostras de sôro apresentaram os títulos seguintes: 1:200 (12), 1:400 (13), 1:800 (3) e 1:1600 (2). Sôros de 14 bovinos aglutinaram a *L. pomona,* sendo: 1:200 (3), 1:400 (6), 1:800 (4). 11 sôros foram positivos para *L. grippotyphosa* — 1:200 (1), 1:400 (6), 1:800 (4), e finalmente houve 2 sôros positivos para *L. canicola* com o título de 1:400.

A fim de verificarmos se as 57 vacas, que apresentaram títulos sorológicos acima de 1:200, eram portadoras e eliminavam, portanto, leptospiras na urina, inoculamos, por via intraperitoneal, 130 cobaias com cêrca de 180 g de pêso.

As amostras de urina das 30 vacas que apresentavam títulos positivos para a *L. icterohemorrhagiae,* inoculadas nas cobaias, não provocaram sintomatologia semelhante à doença de Weil (febre, icterícia e hemoglobinúria ou mesmo a morte dos animais). Cobaias inoculadas com a urina das 27 vacas com títulos sorológicos positivos para as *L. pomona, L. grippotyphosa* e *L. canicola* nada apresentaram de anormal, seja elevação térmica ou sinais clínicos da doença, demonstrando ausência de leptospira no material inoculado. Essa verificação foi repetida em algumas criações e os resultados obtidos foram semelhantes.

Algumas cobaias inoculadas, apesar dos resultados negativos, foram sangradas por punção cardíaca e o sangue semeado nos meios de cultura que, incubados a 28º C, durante 28 dias, não apresentaram crescimento de nenhum microrganismo.

TABELA 1

Pesquisa de aglutininas anti-leptospira no sôro sanguíneo de bovinos

Localidade	N.º de animais examinados	N.º de animais positivos	TÍTULOS SOROLÓGICOS POSITIVOS PARA						
			L. ictero-hemorrhagiae	*L. pomona*	*L. grippotyphosa*	*L. canicola*	*L. bataviae*	*L. australis B*	*L. sejröe*
Piracicaba	50	15	0	2 = 1/ 200 5 = 1/ 400	3 = 1/400 4 = 1/800	1 = 1/400	0	0	0
S. J. B. Vista	120	8	2 = 1/ 400 1 = 1/ 800	1 = 1/ 800 2 = 1/1600	1 = 1/ 400	1 = 1/ 400	0	0	0
Jacareí	80	14	9 = 1/ 200 2 = 1/ 400	1 = 1/ 200 1 = 1/ 400 1 = 1/ 800	0	0	0	0	0
Monte Mór ..	20	2	2 = 1/ 400	0	0	0	0	0	0
S. J. R. Pardo	30	1	0	0	1 = 1/ 200	0	0	0	0
Alvares Machado	50	3	1 = 1/ 200 1 = 1/ 400	1 = 1/400	0	0	0	0	0
Pirapora	20	1	1 = 1/400	0	0	0	0	0	0
Piraçununga ..	47	1	0	0	1 = 1/400	0	0	0	0
S. J. Campos .	80	10	2 = 1/ 200 3 = 1/ 400 2 = 1/ 800 2 = 1/1600	0	1 = 1/400	0	0	0	0
Arujá	20	2	2 = 1/ 400	0	0	0	0	0	0
Outras localidades	246	0	0	0	0	0	0	0	0
TOTAL	763	57	30	14	11	2	0	0	0

Suspensões de órgãos das cobaias inoculadas com a urina das vacas foram injetadas em outras cobaias, com resultados negativos.

Cobaias injetadas com sangue colhido das vacas no período febril ou com suspensões de órgãos de feto (fígado e rins) também nada apresentaram de anormal.

A inoculação de pintos de um dia com urina de vacas suspeitas de leptospiras nada resultou.

Das 763 vacas examinadas, sòmente 10 haviam abortado, porém, nenhuma delas apresentou hemoglobinúria, anemia ou icterícia. Êstes animais apresentaram título sorológico de 1:200, mas de nenhum dêles foi isolada leptospira.

DISCUSSÃO

No sôro sanguíneo de 763 vacas, a pesquisa de aglutininas para *L. pomona, L. grippotyphosa, L. icterohemorrhagiae, L. canicola, L. bataviae, L. australis* B. e *L. sejröe* mostrou que vários animais apresentavam títulos sorológicos acima de 1:200, assim distribuidos: *L. icterohemorrhagiae,* 30; *L. pomona;* 14; *L. grippotyphosa,* 11; *e L. canicola,* 2.

Apesar da presença de aglutininas no sôro dêsses animais, não foi possível o isolamento de leptospiras da urina.

A inoculação de 130 cobaias com urina de vacas, para identificação de animais portadores, não ofereceu um indício siquer de infecção nêsses animais de laboratório. A temperatura manteve-se normal durante cêrca de 15 dias e o sangue colhido no quinto dia após a inoculação e semeado em meios de cultura adequados não apresentou crescimento de nenhuma das leptospiras acima mencionadas.

Apesar de não terem sido isoladas dos bovinos, a *L. icterohemorrhagiae* e a *L. canicola,* cuja existência entre nós já foi demonstrada, não é impossível que elas tenham provocado a doença nêsses animais.

Como não nos foi possível isolar a *Leptospira pomona* e a *L. grippotyphosa,* apesar do grande número de cobaias injetadas com urina e sangue, não podemos afirmar que êsses microrganismos tenham provocado a doença nos bovinos, porque também os títulos sorológicos não eram suficientemente elevados para justificar a infecção. Van Thiel (*16*), tecendo considerações sôbre o diagnóstico sorológico da leptospirose, verificou que na Holanda o título sorológico só deve ser considerado positivo quando 1:300, enquanto que na Indonésia e talvez em outros países tropicais êle recomenda to-

mar como positivos os títulos 1:3000, porque, são freqüentemente encontrados em pessôas normais dessa região títulos até de 1:2500.

Em todo o caso, como os estudos sôbre a leptospirose bovina acham-se ainda em uma fase incipiente, com dados muito escassos para que constituam prova convincente sôbre a existência da doença no Brasil, é possível que com o desenvolvimento dos trabalhos de pesquisa e maior volume de casos, se chegue a uma conclusão diferente, pois que com os resultados até agora obtidos nada se pode afirmar.

CONCLUSÃO

Os autores examinaram o sôro sanguíneo de 763 vacas pelo método de aglutinação-lise. Trinta sôros apresentaram título aglutinante para *L. icterohemorrhagiae,* 14 para *L. pomona,* 11 para *L. grippotyphosa* e 2 para *L. canicola.*

A inoculação da urina dêsses animais em cobaias foi negativa. O conteúdo estomacal de um feto, abortado, inoculado em cobaias, também nada apresentou.

Não tendo sido isoladas as leptospiras, e considerando baixos os títulos sorológicos obtidos, por isso insuficientes para identificação da doença, não é possível afirmar com segurança, por êste inquérito, a existência da infecção provocada nos bovinos por *L. grippotyphosa* e *L. pomona.*

RESUMO

Os autores pesquisaram pelo método de aglutinação-lise, no sôro sanguíneo de 763 vacas, anticorpos para as seguintes espécies de leptospiras: *L. icterohemorrhagiae, L. canicola, L. sejröe, L. australis* B., *L. pomona, L. grippotyphosa* e *L. bataviae.* 30 amostras de sôro apresentaram títulos acima de 1:200 para *L. icterohemorrhagiae;* 14 sôros foram positivos para *L. pomona,* 11 sôros para *L. grippotyphose* e 2 para *L. canicola.* Não foi possível isolar dêsses animais, pela inoculação de urina em cobaia, nenhuma dessas espécies de leptospira.

Os títulos sorológicos baixos, obtidos para a *L. grippotyposa* e *L. pomona,* não permitem afirmar ainda a existência da leptospirose em bovinos por estas espécies no Estado de São Paulo, uma vez que, nêste inquérito, não foram isolados êstes germes.

RESEARCH OF THE AGGLUTININES AGAINST LEPTOSPIRES IN THE BOVINE SERUM, IN THE STATE OF SÃO PAULO

Abstract

Serum samples of 763 bovines were submitted to the agglutination-lysis for L. icterohemorrhagiae, L. canicola, L. grippotyphosa, L. sejröe, L. bataviae, L. pomona and L. australis B.

The tests were positive in 30 cases for L. icterohemorrhagiae, in 14 cases for L. pomona, in 11 cases for L. grippotyphosa, and 2 cases for L. canicola.

The intraperitoneal inoculation of 1 ml of the positive animal urine, and of the contents of one aborted foetus abomasum, into young guinea-pigs, resulted negative.

The low serological titer for L. grippotyphosa and L. pomona do not permit to prove the existence of these kinds of bovine leptospirosis in the State of São Paulo, because these microorganisms could not be isolated in this survey.

BIBLIOGRAFIA

1 — Austoni, M. — 1953 — Le Leptospirosi. Tipografia Seminário, Padova.

2 — Baker, J. A. & Little, R. B. — 1946 — Leptospirosis in cattle. *J. Exp. Med.*, **88**: 295-307.

3 — Bernkopf, H. — 1946 — Experimental work on Leptospirosis in man and cattle in Palestine. *Hafuah*, **30**: 110.

4 — Btesh, S. — 1947 — Infection of man with *L. bovis* in Palestine. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **41**: 419-426.

5 — Field, H. J. & Sellers, K. C. — 1950 — Bovine leptospirosis. *Vet. Rec.*, **62**: 311.

6 — Freitas, D. C., Veiga, J. S., Lacerda Jr., P. M. G. & Lacerda, J. P. — 1957 — Identificação da Leptospirose bovina no Brasil. *Rev. da Facul. Med. Vet.*, **6** (1): 81-84.

7 — Gochenour Jr., W. S. Yager, R. H. & Wetmore, P. W. — 1950 — Antigenic similarity of bovine strains of Leptospirae (United States) and *L. pomona*. *Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y.*, **74**: 199-202.

8 — Hoeden, J. Van der — 1951 — La Leptospirose bovine. *Off. Internat. des Epizoot.*, Rapport à la 19e Session R. n.º 205, 1.

9 — Little, R. B. & col. — 1950 — Bovine Leptospirosis in Pennsylvania. *Vet. Med.*, **45**: 104.

10 — Maria Jr., J. & Quevedo, C. — 1947 — Somera descripcion de una enfermedad de reciente comprobacion en Argentina: Leptospirose bovina, o icterohemoglobinuria infecciosa de los bovinos. *Rev. Med. Vet.*, Buenos Aires, 29: 904-913.

11 — Michin, N. A. & Azinov, S. A. — 1935 — Spirochetal Jaundice of cattle in North Caucasus. *Sov. Vet.*, **10**: 23-27 (Ref.: *Vet. Bull.*, **7**: 419, 1937).

12 — Nicolajeff, J. J. — 1946 — Leptospirosis in U. R. S. S. *Med. Parasit.*, 65 (Ref. *Bull. Hyg.*, **22**: 697, 1947).

13 — Riel, J. van — 1948 — Conceptions actuelles de la leptospirose. *Brux. Med.*, **28**: 2054.

14 — Savino, E. & Renella, E. — 1944 — Leptospira in animales vacunos, equinos y lanares en Argentina. *Rev. Soc. Argent. Biol.*, **20**: 358-363.

15 — Sutherland, A. K., Simmons, G. C. & Kenny, G. C. — 1949 — Bovine Leptospirosis: Three outbreaks in calves in Queensland. *Austr. Vet. Journ.*, **18**: 197.

16 — Thiel, P. H. van — 1948 — Diagnosis and treatment of Leptospirosis. *Proc. 4th Intern. Congr. Trop. Med.*, **1**: 321-327.

17 — Yamamoto, S. — 1951 — De la leptospirose chez les animaux domestiques. *Bull. Off. Int. Epiz.*, **36**: 421-429.

Vol. 26 — Artigo 13 Dezembro de 1959

EXPERIÊNCIAS SÔBRE O CONTRÔLE DA LEPROSE EM CITRUS(*)

POR

Victoria Rossetti[1] e A. A. Salibe[2]

Com as estampas 15 e 16 e 4 figuras no texto

A leprose, uma das principais doenças da laranjeira doce, vem manifestando seu poder destrutivo em número crescente de pomares do Estado de São Paulo, causando perdas apreciáveis. A doença ataca fôlhas, ramos e frutos, produzindo manchas escuras, deprimidas, normalmente circundadas por um halo amarelo. Prejudicando as plantas no seu desenvolvimento, é todavia na fruta que seus danos se fazem sentir com maior intensidade. (Estampa 15).

Não está ainda bem definida a etiologia da doença. Em 1911, FAWCETT & BURGER (*7*) realizaram experiências para determinar a causa da leprose na Florida, denominada "scaly bark" (nos galhos) ou "nail-head rust" (nos frutos), cujos resultados pareciam demonstrar ser a doença causada pelo fungo *Cladosporium herbarum* (PERS.) Lk. var. *citricolum* FAWC. Ainda em 1911, FAWCETT (*8*) publicou um trabalho bastante completo, em que preconizava como método de contrôle a poda das plantas atacadas e pulverizações com calda bordalesa. No Paraguai, em 1920, SPEGAZZINI (*16*) atribuiu a doença, que denominou "lepra explosiva", ao fungo *Amylirosa aurantiorum* SPEG. Sabe-se, hoje, que êsses fungos não são os responsáveis pela leprose.

No Brasil, em 1933 e 1934, BITANCOURT (*1* e *2*), baseado nos trabalhos dos autores americanos, aconselhou a poda completa de tôdas as partes verdes das plantas atacadas, acompanhada de uma série de pulverizações com calda bordalesa, associada a emulsão de óleo mineral, relatando, em 1937 e 1940 (*3* e *4*), os resultados de experiências por êle realizadas nêsse sentido. Ainda do mesmo autor, experiências feitas de 1933 a 1946, cujos resultados foram publicados em 1955 (*5*), mostraram que o melhor combate à leprose foi obtido com pulverizações de calda sulfo-cálcica e outros compostos à base de enxôfre; nos casos de ataque grave, aconselhava a poda total das plantas atacadas, feita no início do inverno.

FREZZI, em 1940 (*10*), e VERGANI, em 1945 (*17*), demonstraram que a doença, na Argentina, é transmitida pelo ácaro *Tenuipalpus*

(*) Recebido para publicação em 9 de dezembro de 1959.

(1) Do Instituto Biológico de S. Paulo.
(2) Do Instituto Agronômico de Campinas.

pseudocuneatus BLANCH., que agiria como vector de um vírus (*10*), ou produzida pela ação tóxica de sua saliva (*17*). O primeiro dêsses autores publicou os resultados de experiências de contrôle, demonstrando serem mais eficientes os tratamentos à base de enxôfre. KNORR (*11*) [e KNORR, SUIT & DUCHARME (*13*)], depois de ter observado na Flórida a presença de um ácaro do gênero *Brevipalpus* associado à leprose, publicou, em colaboração com THOMPSON, em 1954 (*12*) resultados de experiências sôbre o seu contrôle, em que demonstraram que uma só aplicação de enxôfre molhável no ano, é suficiente para combater a leprose. Bons resultados foram obtidos também com o emprêgo de outros produtos.

Em trabalho recente, KNORR (*14*) cita o ácaro *Brevipalpus californicus* BANKS como causador da doença. Em São Paulo, foi recentemente encontrado o ácaro *B. phoenicis*, GEIJSKES sempre presente em plantas atacadas de leprose (*15*).

Com o sucesso obtido no contrôle do ácaro da "ferrugem" por meio de zineb (Dithane Z-78), tornou-se interessante investigar se êste produto controlaria também os ácaros responsáveis pela leprose, nos laranjais paulistas.

Por êsse motivo foram feitas experiências na Estação Experimental de Citricultura de Limeira, do Instituto Agronômico de Campinas, com o fim de se estabelecer a eficiência do zineb no contrôle da doença, em comparação com outro produto acaricida, o Kelthane W.

Os autores consignam seus agradecimentos ao DR. CARLOS ROESSING, Chefe da Estação Experimental de Limeira, bem como aos seus auxiliares, pela sua cooperação na realização dessas experiências.

PRIMEIRA EXPERIÊNCIA

Em 10 de outubro de 1958, 21 mudas de laranja pêra, de um ano, foram transplantadas debaixo de uma laranjeira da mesma variedade, de 22 anos de idade, muito infectada de leprose. As mudas foram localizadas em círculo na projeção da copa da árvore, a 1,50 m do tronco, distanciadas 50 cm uma da outra, de maneira que suas fôlhas estivessem em contato com as da árvore, para que se infectassem naturalmente.

Essas plantas foram submetidas mensalmente (com exceção do mês de junho de 1959) a três tratamentos, distribuidos ao acaso, em 7 repetições: plantas testemunhas, sem pulverização; plantas pulverizadas com Dithane Z-78 (etileno bis ditiocarbamato de zinco — 65%), na proporção de 150 gramas por 100 litros de água; e plantas trata-

das com Kelthane W (1-1-bis clorofenil 2, 2, 2-tricloroetanol — 18,5%) na proporção de 200 gramas por 100 litros de água. Cada planta tratada recebia aproximadamente 500 cm³ da solução do produto, o suficiente para molhar perfeitamente tôda a folhagem, tronco e galhos.

Sob outra árvore semelhante foram ainda colocadas, em círculo, na projeção da copa, algumas plantas jovens das variedades: hamlin, tangerina cravo, pomelo e limão eureca, plantadas em caixas de madeira, dispostas de maneira a haver plantas de cada uma das variedades no lado norte e no lado sul da árvore; tais mudas não foram submetidas a tratamentos. As árvores de laranja pêra, escolhidas como fonte de infecção natural, não receberam nenhum tratamento ou pulverização desde agôsto de 1958, nem durante todo o decorrer da experiência; as mudas foram irrigadas três vêzes por semana.

Em 7 de abril e 9 de novembro de 1959 foram feitas as leituras, contando-se as manchas de leprose das fôlhas e galhos. Na tabela I estão representados os números médios e totais de manchas encontradas em 7 plantas de cada tratamento. Na segunda coluna está o número de plantas grupadas de acôrdo com sua posição: passando uma linha divisória perpendicular ao eixo norte-sul foram separadas 10 plantas no hemisfério norte e 11 no hemisfério sul.

Tabela I — Números médios e totais de lesões de leprose observados em abril e novembro em plantas localizadas nos lados norte e sul de uma árvore infectada, e submetidas a diferentes tratamentos.

Table I — Average and total numbers of leprosis lesions on leaves and twigs, observed in april and november, on young plants placed under a highly infected tree, and submitted to monthly traeatments. The data from trees placed on the northern and on the southern parts of the tree have been separated.

Tratamento	Número de plantas		Números médios de lesões				Números totais de lesões	
			7-4-59		9-11-59		7-4-59	9-11-59
	N	S	N	S	N	S		
Testemunha .	5	2	4,4	0,50	36,5	16,5	23	214
Dithane Z-78 .	2	5	2,5	0,00	15,0	4,2	5	51
Kelthane W .	3	4	0	0,00	8,3	5,5	0	47
Médias			2,7	0,09	23,7	6,9		

Os dados da tabela I demonstram a ocorrência de manchas de leprose que, nas plantas localizadas na parte norte, é cêrca de três vêzes maior do que nas localizadas na parte sul. Essas diferenças se repetem nos três tratamentos, o que parece indicar que há preferência marcada do ácaro pela maior exposição à luz solar.

Êsses resultados são confirmados pelas observações feitas nas mudas plantadas em caixas de madeira: em duas laranjeiras da variedade hamlin colocadas na face norte a contagem final foi, em média, de 67,5 lesões, enquanto que em uma planta da mesma variedade, da face sul, o número de manchas foi 13. Uma tangerina cravo colocada na face norte mostrou 4 manchas nas fôlhas, e nenhuma foi observada em outra planta da mesma espécie localizada na face sul.

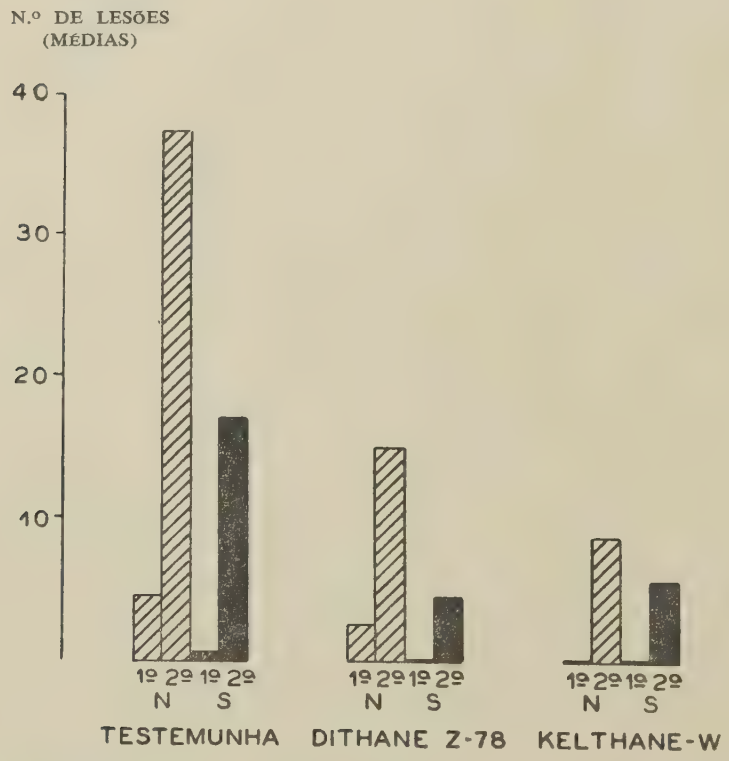


Fig. 1 — Número médio de lesões em fôlhas de plantas tratadas e não tratadas, da 1.ª experiência, de leituras feitas em abril e novembro. As colunas hachuradas referem-se às plantas localizadas na direção norte e as colunas pretas, na direção sul.

No gráfico da figura 1 estão representados em colunas hachuradas, os números médios de lesões das plantas situadas na face norte, e em colunas pretas os das mudas situadas na face sul, resultantes das contagens feitas na primeira e segunda leituras.

Nesta experiência, tanto o Dithane Z-78 como o Kelthane parecem ter controlado, em parte, a ocorrência da leprose pois, em relação às plantas testemunhas, o número de lesões foi aproximadamente de 23,8% nas plantas tratadas com Dithane e de 21,9% nas tratadas com Kelthane, no resultado final.

Nesta experiência houve variação na incidência da doença de planta para planta. Assim, em dois casos de plantas vizinhas tratadas com Kelthane W, contaram-se 19 e 3 lesões, em um caso, e no outro, 17 e 0 lesões. Entre as testemunhas, em duas plantas próximas, da face sul, foram encontradas 32 lesões em uma delas e apenas 1 na outra.

SEGUNDA E TERCEIRA EXPERIÊNCIAS

Em 10 de novembro de 1958, 60 mudas de laranjeiras da variedade pêra, idênticas às descritas na experiência anterior, foram transplantadas para vasos de barro de 40 cm de abertura e 50 cm de altura, e podadas levemente.

Em 26 de novembro, dêsse grupo foram separados dois lotes de 30 plantas, submetidas aos mesmos três tratamentos descritos na experiência anterior, com 10 repetições. As 30 mudas de um dos lotes (2.ª experiência) foram distribuidas ao acaso e colocadas sôbre um estrado de 1 m de altura, de forma octogonal, construído debaixo da mesma laranjeira pêra que serviu para a 1.ª experiência de modo que cada lado do octógono era ocupado por 3 ou 4 vasos. As outras 30, da 3.ª experiência, foram colocadas, também em distribuição ao acaso, sôbre um idêntico estrado, construído debaixo de outra laranjeira pêra igualmente infectada de leprose. Êsse método foi inspirado em experiências anteriormente realizadas por Bitancourt (*5*).

Nos dois lotes, os tratamentos foram repetidos mensalmente, com exceção do mês de junho de 1959, quando não foram feitas pulverizações. Os vasos eram retirados dos estrados e classificados por tratamento. Fazia-se, mensalmente, a contagem das manchas de leprose, tanto nas fôlhas como nos galhos e tronco. Depois de pulverizadas as plantas com Dithane Z-78 e com Kelthane W, os vasos eram recolocados sôbre os estrados, tendo-se o cuidado de mudar a sua posição de 45 graus, isto é, os vasos que ocupavam cada lado do octógono durante um mês eram mudados no mês seguinte. (Estampa 16).

Dessa maneira, se as árvores estivessem mais infectadas de um lado que do outro, as plantas novas, que tinham suas fôlhas entremeadas em sua copa, estariam expostas à infecção de maneira homogênea.

No último mês observou-se uma queda anormal de fôlhas das plantas novas. Também uma das árvores vinha sofrendo, desde junho, queda abundante de fôlhas, talvez devido à concorrência das mudas da 1.ª experiência, plantadas no solo ao seu redor.

As lesões de leprose nas fôlhas sòmente começaram a aparecer em fevereiro, isto é, três meses depois de expostas as plantas à in-

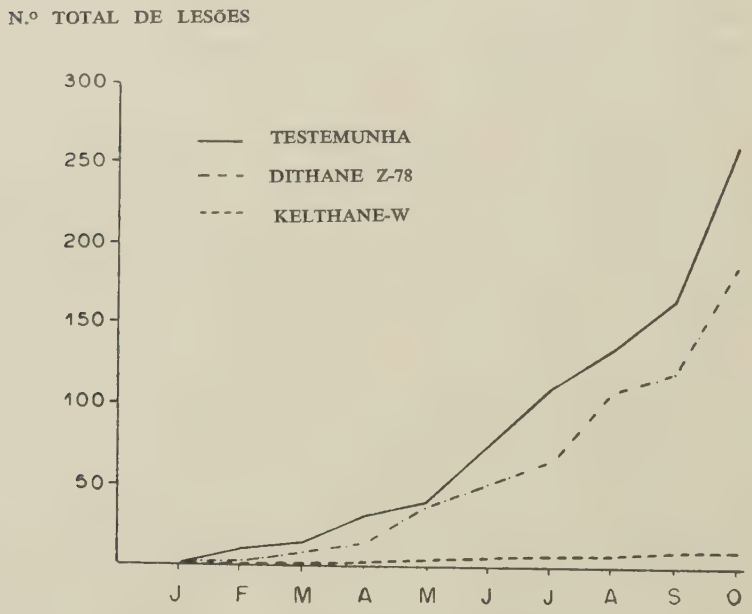


Fig. 2 — Número total de lesões de leprose em fôlhas de plantas tratadas e não tratadas, da 2.ª experiência, em leituras feitas mensalmente.

fecção natural, e mais tarde, nas plantas tratadas com Kelthane W. As primeiras lesões nos galhos e no tronco sòmente foram observadas no mês de maio.

Os gráficos das figuras 2 e 3 mostram os resultados das contagens mensais, respectivamente na 2.ª e na 3.ª experiências. O gráfico da figura 4 mostra o acréscimo mensal de lesões, sòmente para as plantas testemunhas das duas experiências.

Nas duas experiências, o maior acréscimo de lesões nas plantas testemunhas e nas tratadas com Dithane Z-78 foi observado no mês de outubro, enquanto que nas tratadas com Kelthane W o ataque foi reduzido e as diferenças de um mês a outro foram pequenas.

A variação entre as plantas foi muito acentuada; na 2.ª ex-

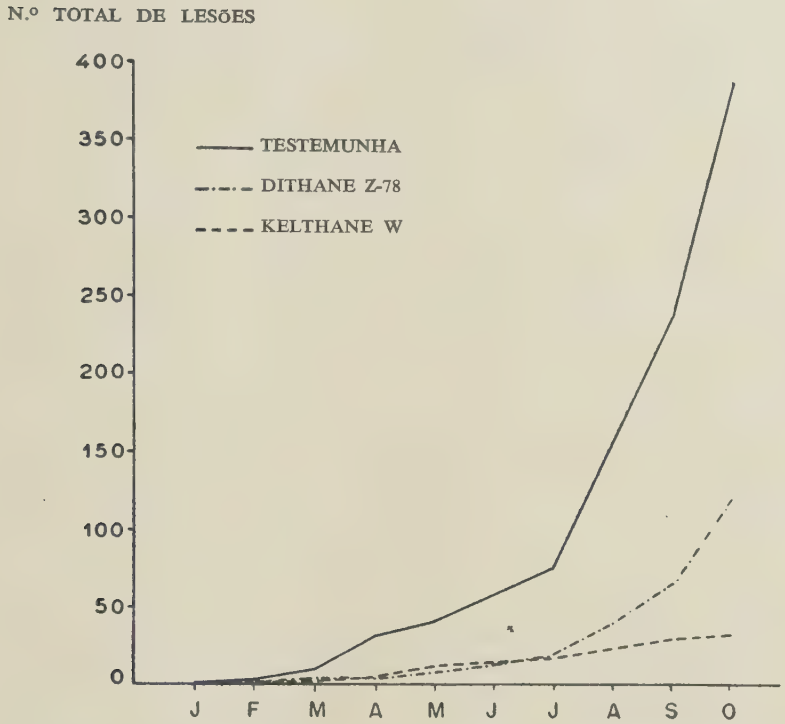


Fig. 3 — Número total de lesões de leprose em fôlhas de plantas tratadas e não tratadas, da 3.ª experiência, em leituras feitas mensalmente.

periência, foi de 2 a 153 lesões, de 4 a 36 e de 0 a 2, respectivamente, para cada tratamento; na 3.ª experiência, foi de 13 a 130 de 5 a 38 e de 1 a 7 lesões, para cada grupo.

Considerando os dados finais totais colhidos em outubro, comparando as plantas pulverizadas com as testemunhas, verificou-se, na 2.ª experiência, que a ocorrência da leprose foi de aproximadamente 66% e 2,7%, respectivamente, para os tratamentos com Dithane Z-78 e com Kelthane W; na 3.ª experiência, essas porcentagens foram, respectivamente, de 31,8% e 8,2%.

Em ambos os casos, o Kelthane W controlou a doença de maneira satisfatória, enquanto que o Dithane Z-78 protegeu as plantas apenas parcialmente. Êsse resultado, aliás, é claramente visível nos gráficos das figuras 2 e 3.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Em tôdas as experiências, as manchas nas fôlhas sòmente começaram a aparecer a partir de três meses após terem sido as plantas expostas à infecção natural, embora suas fôlhas estivessem em contato direto com a folhagem das árvores que serviram como fontes de inóculo; o Kelthane W retardou o aparecimento das primeiras lesões de leprose. De junho e julho em diante, verificou-se maior aumento da doença, de mês para mês. Observaram-se grandes variações de planta para planta, o que não permitiu a aplicação de métodos estatísticos para a análise dos dados. Êsses fatos confirmam as observações de VERGANI, em 1945 (*17*), quando, infestando artificialmente plantas jovens com ácaros, obteve as primeiras lesões em períodos variáveis desde 55 dias até 18 meses, fazendo supor a existência de diferentes gráus de resistência das plantas.

A primeira experiência mostrou que nas plantas expostas à maior incidência da luz solar as lesões apareceram antes e foram três vêzes mais abundantes do que as localizadas na face sul, menos ensolarada. Êsses dados também confirmam as observações de VERGANI, que obteve mais rápida infestação nas plantas expostas à ação direta dos raios solares do que nas mantidas em insetário.

Na primeira experiência não houve bom contrôle da doença pelo Kelthane W, que diferiu pouco dos resultados obtidos com Dithane Z-78; ambos os produtos protegeram parcialmente as plantas. Entretanto, considerando-se a freqüência de plantas com elevado número de lesões, observa-se que, dentre 7, apenas 2 mudas mostraram um número de manchas maior do que 5, enquanto no grupo tratado com Dithane Z-78, essa freqüência foi de 5 dentre 7 plantas.

Nas outras duas experiências, o Kelthane W mostrou-se altamente satisfatório, nas condições experimentais dêste trabalho. O fato de não terem sofrido as plantas testemunhas qualquer tratamento que as tornasse perfeitamente comparáveis com as dos grupos tratados (como uma pulverização mensal com água) poderia ser considerado como uma possível causa de êrro no julgamento da eficiência dos acaricidas empregados. Ainda assim, a porcentagem de lesões nas plantas tratadas por êsse produto, em relação às pulve-

rizações com Dithane Z-78, foi aproximadamente de 4,2% e 25,7%, respectivamente, na 2.ª e 3.ª experiências.

Reunindo os dados finais dessas duas experiências e computando-se a porcentagem da incidência da doença em relação ao número total — 1055 — de lesões, obtêm-se 65,8% nas plantas testemunhas, 30,3% nas tratadas com Dithane Z-78 e apenas 3,9% nas tratadas com Kelthane W, ou 12,8% quando comparadas estas últimas com o número de lesões nas plantas do grupo anterior. Observou-se também que o Dithane Z-78, na concentração empregada, não teve

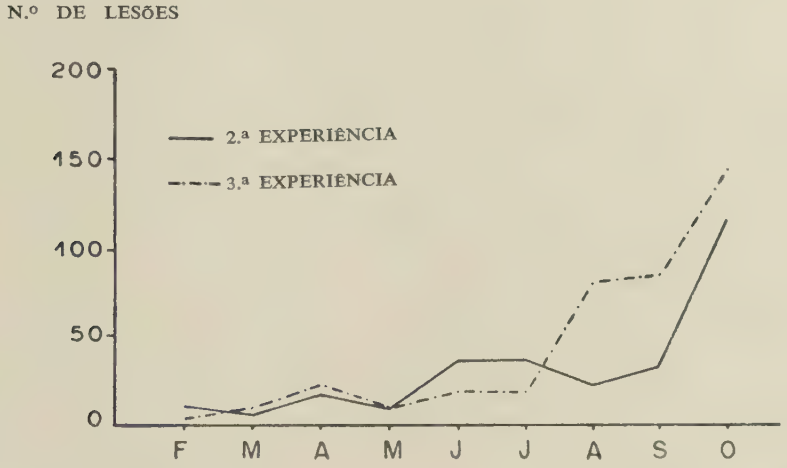


Fig. 4 — Acréscimo mensal do número de lesões de leprose em fôlhas das plantas testemunhas.

efeito no contrôle da "melanose" (doença causada pelo fungo *Diaporthe citri*, Wolf) que ocorreu com intensidade nas plantas em experiência.

O Dithane Z-78, que se mostrou bastante eficiente no contrôle do ácaro causador da ferrugem — *Phyllocoptruta oleivora*, Ashm. — tanto na Flórida como no Brasil, apenas controlou parcialmente o ácaro da leprose, e de maneira não satisfatória. Êsses resultados apoiam a sugestão de Bitancourt, em artigo recentemente publicado (*6*), de que as aplicações exclusivas do Dithane Z-78 nos pomares, com o fim de combater a ferrugem, devem ser evitadas, devendo-se intercalá-las com outros acaricidas. Não controlando os outros ácaros, êsse produto pode romper o equilíbrio biológico, promovendo indiretamente a sua maior multiplicação.

Os resultados preliminares obtidos nêste trabalho são promissores e parecem autorizar a considerar-se o emprêgo do Kelthane W na proporção de 200 gramas para 100 litros de água como um bom tratamento para o contrôle da leprose. Êsse produto está sendo novamente estudado em comparação com outros acaricidas, alguns clássicos e outros novos, em experiências de campo.

EXPERIMENTS ON THE CONTROL OF LEPROSIS OF CITRUS

Abstract

Since Dithane Z-78 (zinc ethylene bis-dithiocarbamate) has proved to be efficient on the control of the Citrus rust mite Phyllocoptruta oleivora, some experiments have been carried out in order to compare this product and the miticide Kelthane W (1, 1 — bis chlorophenyl 2, 2, 2 — trichloroethanol) with non treated plants on the control of Citrus leprosis.

Young susceptible potted and non potted plants were continually exposed to natural infection for one year, under and around heavily diseased sweet orange trees of the "pera" variety.

On the first experiment, 21 one year old plants were planted close around an infected tree, distributed at random, and monthly submitted to three treatments: non treated plants, Dithane Z-78 spray and Kelthane W spray.

The results of this experiment show a marked difference between non treated and treated plants. For both products there was a partial control of the disease. The percentage of lesions calculated in relation to the non treated group was 23.8% for Dithane Z-78 and 21.9% for Kelthane W. It was also demonstrated that there is a higher incidence of the disease on plants exposed to the northern side, in which the number of lesions was three times as high as on the southern side, for the three groups. This fact shows a marked preference of the leprosis associated mite for a more intense sun light exposition.

On the second and third experiments, young potted sweet orange plants were submitted to the same treatments, but their position under the tree was changed on 45 degrees every month in order to avoid the influence of sun ligth exposition.

Results of both experiments show highly efficient protection against the disease due to Kelthane W, under experimental conditions. Adding the data for both experiments, while control and

Dithane Z-78 treated plants showed respectively 65.8% and 30.3%, the plants sprayed with Kelthane W showed only 3.9% of the total lesions (1055).

High individual variation of the data did not permit using statistical methods for their analysis.

On all experiments first lesions appeared after three months from the beginning of exposition to natural infection.

The results are promising and seem to permit considering Kelthane W, when employed on the proportion of 200 grams for 100 liters of water, as a good miticide for the control of leprosis.

Kelthane W is being submitted to new field experiments in which it will be compared to other miticide products, either classical and modern ones.

BIBLIOGRAFIA

1 — Bitancourt, A. A. — 1933 — Doenças dos Citrus, *in* Manual de Citricultura, II Parte — 212 pp. Chácaras e Quintais, São Paulo.

2 — Bitancourt, A. A. — 1934 — As manchas das laranjas. Folheto N.º 53, 135 pp. Instituto Biológico. Secretaria da Agricultura. São Paulo.

3 — Bitancourt, A. A. — 1937 — A leprose e a próxima colheita de laranjas. *Biológico*, **3**: 37-40.

4 — Bitancourt, A. A. — 1940 — A leprose dos Citrus. *Biológico*, **6**: 39-45.

5 — Bitancourt, A. A. — 1955 — Estudos sôbre a leprose dos Citrus. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, **22**: 161-231.

6 — Bitancourt, A. A. — 1959 — O combate aos ácaros dos Citrus pelos ditiocarbamatos. *Biológico*, **25**: 227-232.

7 — Fawcett, H. S. & O. F. Burger — 1911 — A variety of *Cladosporium herbarum* on *Citrus aurantium* in Florida. *Phytopathology*, **1**: 164-166.

8 — Fawcett, H. S. — 1911 — Scaly bark or nail-head rust of Citrus. Bull. 106, 41 pp. University of Florida, Gainesville, Florida.

9 — Fawcett, H. S. — 1936 — Citrus diseases and their control, 2nd. ed. Mc Graw-Hill Book Company, Inc., pp. 252-260.

10 — Frezzi, M. J. — 1940 — La lepra explosiva del naranjo. Boletin Frutas y Hortalizas, 15 pp. Ministério de Agricultura de la Nación. Buenos Aires.

11 — Knorr, L. C. — 1950 — Etiological association of a *Brevipalpus* mite with Florida scaly bark of citrus (Abstract) *Phytopathalogy*, **40**: 15.

12 — KNORR, L. C. and W. L. THOMPSON — 1954 — Spraying trials for the control of Florida scaly bark in Citrus. *Plant Dis. Reptr.*, **38**: 143-146.

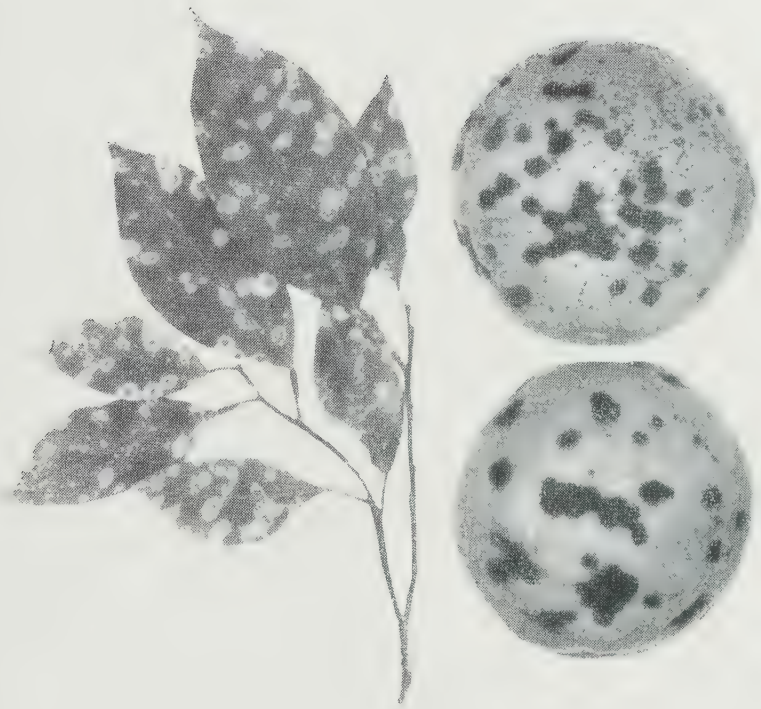
13 — KNORR, L. C., R. F. SUIT & E. P. DUCHARME — 1957 — Handbook of Citrus diseases in Florida. Bull. 587, 157 pp. University of Florida, Gainesville, Florida.

14 — KNORR, L. C. — 1959 — Preventing *Brevipalpus* mites and some questions that they pose. *Citrus Magaz.*, **21** (10): 12, 20, 22.

15 — ROSSETTI, V., T. G. FASSA & M. R. MUSUMECI — Novo ácaro dos laranjais paulistas — *Biológico*, **25**: 273-275.

16 — SPEGAZZINI, C. — 1920 — Sôbre algunas enfermedades y hongos que afectan las plantas de "agrios" en el Paraguay. *Ann. Soc. Cient. Argentina*, **90**: 155-188.

17 — VERGANI, A. R. — 1945 — Transmission y naturaleza de la "lepra explosiva" del naranjo. Bol. n.º 3, Año 1, Serie A., 10 pp. Ministerio de Agricultura de la Nación. Republica Argentina.



Fôlhas e frutos de laranjeira doce com lesões de leprose. Tirado de BITANCOURT *(5)*.

Mudas de laranjeira pêra de um ano de idade, em vasos colocados sôbre estrado, mostrando as fôlhas entremeadas com a folhagem que serviu como foco de infestação natural. Fora do estrado, mudas de laranjeira pêra plantadas ao redor da mesma árvore e submetidas aos mesmos tratamentos que as plantadas em vasos.

Vol. 26 — Artigo 14 Dezembro de 1959

NOVO MÉTODO COLORIMÉTRICO PARA A LOCALIZAÇÃO, NA CROMATOGRAFIA EM PAPEL, DE INSETICIDAS DO GRUPO DOS ÉSTERES DO ÁCIDO TIOFOSFÓRICO(*)

POR

O. Giannotti e L. Marques de Sá(1)

Do Instituto Biológico de São Paulo

Dos métodos colorimétricos descritos para localizar, nas cromatografias em papel, os inseticidas fosforados do grupo dos tiolfosfatos e tionofosfatos, nenhum satisfaz plenamente. Entre outros inconvenientes, a pouca sensibilidade ou a especificidade para determinados compostos são fatores limitantes do uso generalizado dos mesmos. Assim é que, existe processo bastante sensível para determinação do "Parathion" ou 0,0-dietil 0-p-nitrofenil tionofosfato e do "E. P. N." ou etil p-nitrofenil benzeno tionofosfanato, descrito por METCALF & MARCH (*4*), onde, pela pulverização do papel com solução alcoólica de KOH a 5% e posterior aquecimento a cêrca de 105° C, o ion p-nitrofenato é liberado dando uma intensa côr amarela. Entretanto, para os outros inseticidas dêsse grupo, desprovidos do radical p-nitrofenol, como o "Systox" — mistura de 35% de 0,0-dietil S-2 etil-mercaptoetil tiofosfato (isômero tiol) e 65% de 0,0-etil 0-2 etilmercaptoetil tionofosfato (isômero tiono) —, o "Thimet" — 0,0-dietil S-etilmercapto metilfósforo ditioato —, o "Disyston" — 0,0-dietil S-etilmercaptoetilfosforoditioato — e outros, o processo acima referido não pode ser aplicado.

Outras tentativas, no sentido de desenvolver processos gerais colorimétricos para êsse tipo de compostos, não produziram, de forma completa, os resultados desejados. A primeira delas, foi feita por MARCH, METCALF & FUKUTO (*3*), que usaram o mesmo método por êles empregado na localização do "Schradan", o qual consiste em pulverizar o papel com uma solução composta de 5 ml de ácido perclórico a 72%, 25 ml de molibdato de amônio a 4%, 10 ml de HCl normal e 60 ml de H_2O, com posterior aquecimento a 80° C por 2 minutos. Sob essas condições, êsse inseticida hidrolisa-se e dá uma côr azul de fosfomolibdeno. A aplicação dêsse processo ao "Systox" mostrou que êsse inseticida é sensível apenas na ordem de 25-50 μg.

(*) Recebido para publicação em 16 de dezembro de 1959.

(1) Estagiário da Secção de Inseticidas. Farmacêutico do Instituto médico-legal do Estado de São Paulo.

Posteriormente, Cook (*1*) descreveu um método onde o "Systox", "Parathion" e outros inseticidas dêsse grupo se mostraram sensíveis até à ordem de 1-2 μ g. Segundo êste método, o cromatograma é primeiramente pulverizado com bromosuccinimida normal e a seguir com fluorosceína. O bromo, fornecido pelo primeiro composto, reage com os inseticidas, o que não ocorre no resto da superfície do papel. A aplicação de fluorosceína torna as manchas de inseticidas fluorescentes, visíveis à luz ultra violeta, enquanto no resto da superfície do papel, pela reação entre êste composto e a bromosuccinimida, forma-se produto não fluorescente. Entre as desvantagens dêsse método, a mais importante, segundo Otter (*6*), resulta do fato de que o contrôle da quantidade de bromosuccinimida normal a ser aplicada é extremamente importante, pois, um excesso da aplicação da mesma determinaria, lògicamente, um excesso de bromo sôbre a superfície das manchas dos inseticidas. Nestas condições, a fluorosceína a ser aplicada posteriormente no cromatograma seria completamente destruida, impedindo o aparecimento das manchas. Além do mais, êste processo não dá resultados com relação aos metabolitos do "Systox", "Metasystox" e com tôda certeza do "Thimet" e do "Disyston".

Mais recentemente, Otter (*6*) verificou que, depois do tratamento com bromosuccinimida normal, êsses inseticidas hidrolisam-se com mais facilidade. Nessas condições, a pulverização do cromatograma com molibdato de amônio e posterior exposição à luz ultra violeta por 10-20 minutos, determina a formação de manchas azuis. A sensibilidade dêste método vai até a ordem de 7 μ g. Pelas dificuldades apresentadas por êsses métodos e pela sua especificidade, os trabalhos referentes ao estudo bioquímico dessas substâncias, bem como a determinação residual das mesmas nos mais diversos tipos de vegetais, se faz, principalmente, empregando a técnica de marcar o inseticida por meio dos isótopos P^{32} e S^{35}.

No presente trabalho, será apresentado um novo processo, que pela sua simplicidade e eficiência poderá ser de grande utilidade no estudo das referidas substâncias.

MATERIAL E MÉTODOS

Durante uma série de determinações, em que procuravamos separar e localizar os inseticidas DDT ou paradiclorofenil tricloretano, isômero gama do BHC ou hexaclorociclohexana, e "Parathion" pelos processos já conhecidos em cromatografia de inseticidas, ve-

rificamos que o simples tratamento do papel com $AgNO_3$ e posteriormente com KOH, determinava a revelação do "Parathion".

É interessante consignar que Cook (*1*), ao descrever o seu método em que se usa a bromosuccinimida normal, cita, ao se referir aos trabalhos preparatórios para elaborar um processo cromatográfico para "Systox", que êste inseticida poderia ser localizado pela pulverização do papel com uma solução diluída de $AgNO_3$ e subseqüente exposição à luz ou a agente redutores ou a ambos. Entretanto, achou ser mais satisfatória a técnica que se baseia no emprêgo da bromosuccinimida.

Os reagentes e a técnica por nós utilizada foram as seguintes: a) Solução de $AgNO_3$ a 0,05 N em etanol; b) Solução normal de NaOH em metanol; c) Solução aquosa de HNO_3 a 1 + 3.

Os inseticidas experimentados bem como os metabolitos ativos formados como decorrência de sua aplicação em plantas de algodão, foram os seguintes: "Parathion", "Systox", "Thimet" e "Disyston"(2) em solução acetônica onde cada 0,001 ml continha 0,5 μg dos mesmos. Os metabolitos do "Systox", "Thimet" e "Disyston" foram extraídos pela técnica descrita por Metcalf, Fukuto & March (*5*), em 1957, usando-se de 1 a 5 g de fôlhas de algodão.

Para se ter uma idéia mais segura sôbre a eficiência do método em estudos, os inseticidas acima citados, bem como os metabolitos ativos de "Systox", "Thimet" e "Disyston", foram submetidos à cromatografia ascendente em papel, pelo processo já descrito por March, Metcalf & Fukuto (*3*) em 1954 e Fukuto, Metcalf, March & Maxon (*2*) em 1955, que consiste em impregnar tiras de papel de Filtro Whatman n.º 1 com Silicone 550 da Down Corporation, o que se consegue, mergulhando-as em solução a 5% dessa substância em éter de petróleo. Como solvente móvel foi empregada a camada superior de uma mistura de 10 partes de etanol a 95%, 10 partes de clorofórmio e 6 partes de água. Dessa maneira, realizamos a cromatografia, empregando de 0,5 a 10 μg de cada inseticida acima citado e o total do resíduo do extrato de 1-5 gramas de fôlhas de algodoeiros, que receberam tratamentos com "Systox", "Thimet" e "Disyston".

Uma vez terminada a cromatografia, isto é, depois do solvente móvel ter percorrido 15 cm das tiras de papel, foram as mesmas secadas à temperatura ambiente por 20-30 minutos. Em seguida pulverizadas, leve e uniformemente, com a solução de $AgNO_3$. Depois de aparentemente sêcas, isto é, ao fim de um período de 10 a 15 mi-

(2) Agradecemos às firmas American Cianamid que forneceram "Parathion" técnico a 96% e ampolas de "Thimet", com pureza de 99%, bem como à Bayer, pela cessão de "Systox" e "Disyston" técnicos, com 95% de pureza.

nutos, foram pulverizadas, também leve e uniformemente, com a solução de NaOH. As manchas começam a aparecer depois de 10 a 15 minutos, principalmente quando quantidades maiores de inseticidas são usadas, como 5-10 μg. Entretanto, obtivemos melhores resultados deixando os papéis assim pulverizados até o dia seguinte, ocasião em que os mesmos se apresentavam com uma coloração castanho-escura. Mesmo neste estágio, é possível constatar a presença das manchas, que se apresentam com uma tonalidade bem mais escura. Pulveriza-se, então, o papel, leve e ràpidamente, e com uma pressão mais ou menos forte a fim de que as partículas do líquido sejam bem pequenas, com a solução de HNO_3, tendo o cuidado de não usar quantidade excessiva dêsse reagente, o que destruiria as manchas, tornando o papel completamente branco. Depois de curto espaço de tempo, as manchas aparecem bem definidas, de côr castanho-escura, em contraste com o amarelo-pardacento das tiras de papel.

Para maior realce das manchas, às vêzes torna-se necessário pulverizar uma segunda vez com a solução de HNO_3, porém sempre de forma leve e ràpidamente. A seguir, as tiras de papel são lavadas 2-3 vêzes com água bi-destilada. Tentamos utilizar o HNO_3 mais diluído, porém, sem obter resultados melhores dos que temos obtidos até o momento. Outro ponto importante, é que os papéis a serem usados nas cromatografias e sôbre quais vai ser aplicado o método, devem estar, da forma mais completa possível, livres de cloro, o que se consegue lavando-se diversas vêzes com água bi-destilada.

RESULTADOS GERAIS E DISCUSSÃO

Com a técnica empregada, obtivemos reação positiva e bem nítida com 1 μg de "Parathion", 2 μg de "Systox", (que corresponde a cêrca de 1,4 μg do isômero "tiono" e 0,6 μg do isômero tiol), 0,5 μg de "Thimet" e "Disyston". Pudemos determinar, depois de 18 e 45 dias, os metabolitos ativos do "Thimet" e do "Disyston" em plantas de algodão oriundas de sementes tratadas com êsses inseticidas adsorvidos em carvão, na proporção de 2% de princípio ativo.

Depois de 18 dias, constatamos a presença de 2 manchas para o "Thimet" e 3 para o "Disyston", empregando o extrato de 1 g de fôlhas; depois de 45 dias, enquanto no "Disyston" ainda notava-se a presença de 2 manchas, o "Thimet" dava resultados negativos. Evidentemente, trata-se dos derivados "sulfóxidos" e "sulfonas" dêsses inseticidas, que se formam, de acôrdo com os trabalhos de METCALF, FUKUTO & MARCH (5), nos tecidos das plantas.

Finalmente, caracterizamos os dois principais metabolitos do "Systox" analisando, depois de 3 dias, o resíduo de fôlhas de plantas de algodoeiros pulverizados com fórmula comercial dêsse inseticida a 0,1%.

Portanto, comparando os resultados até agora conhecidos com aquêles por nós obtidos, podemos afirmar que, de modo geral, a técnica por nós descrita, além da sua maior simplicidade, apresenta resultados tão ou mais sensíveis para êsse tipo de inseticidas, podendo, nessas condições, ser de grande utilidade nos estudos bioquímicos e residuais dêsse grupo de substâncias. Além disso, consideramos extremamente interessante o fato de terem sido obtidos resultados positivos com os metabolitos ativos do "Systox", "Thimet" e "Disyston", o que não tinha sido verificado com os processos descritos até o momento. A identificação dos compostos acima referidos só tem sido possível com o emprêgo de isótopos, técnica, como é do conhecimento geral, bastante cara e complicada e que não pode ser empregada na análise residual de alimentos.

A NEW METHOD FOR LOCATING, ON PAPER CHROMATOGRAPHY, THE INSECTICIDES OF THE THIOPHOSPHATES ESTERS GROUP

Abstract

A new and very simple method is described for detecting small quantities of organic phosphate insecticides of the Thiolphosphate and Thionosphosphate groups. The technique consists, after the development of the chromatogram, in spraying, slightly and uniformely, the paper with a solution of 0,05 N of $AgNO_3$ in ethanol. After 10-15 minutes, when apparently dried, the paper is re-sprayed with a normal solution of NaOH in metanol.

The whole paper starts to dark, giving a slight brown background, where, in 5-10 minutes, the spots start to be visible as a deeper brown colour. After a period of approximately 15-20 hours, that was established in order to have the reaction as complete as possible, the paper is again sprayed with a water solution of HNO_3 (3 parts of HNO_3 and 1 of water) quickly and uniformely, what becomes the background yellow-brown, leaving the spots of the insecticides with a dark-brown colour. In our works, we usually spray the HNO_3 solution in the next day of the application of $AgNO_3$ and NaOH on the paper. It seems that insecticides with higher percent of S give

darker spots, while those with less amount of this element give spots toward a dark-violet colour. In some cases it is necessary to spray a second time with the HNO_3 solution, in order to get a better contrast between the dark-brown of the spots and the yellow to slighthy brown background of the paper. At this point, the paper must be washed with bidistillate water. An excess of spray with the HNO_3 solution would cause the disappearing of the spots, leaving all the paper white. Others critical points of the method are discussed, and has been found that the papers have to be well washed with bi-distilate water to eliminate the chlorine that can interfere with the process. Even so, when the chromatogram is developed with biological extracts, we found that in very small areas of the front of the solvent there are some interferences by the darkening of the paper.

In order to have a more precise idea of the method, we used it in conjunction with the paper chromatographic processes applied for the separation and characterization of this group of insecticides, and described by March, Metcalf and Fukuto in 1954 and Fukuto, Metcalf, March and Maxon in 1955.

Of these processes, we found that this process can't be used when the paper is impregnate with propyleneglycol, since we get a heavy darkening of the paper, difficult to remove with the sprays of HNO_3 solution.

Using papers impregnated with silicone 550, and as mobile solvent the upper part of a mixture of 10 parts of ethanol, 10 parts of chloroform and 6 parts of water, we could detect, as very clear and distinct spots, 1-2 μg of "Parathion", 2 μg mg of tecnical "Systox" (thiol and thiono isomer), 0.5 μg of "Thimet" and 0.5 μg mg of "Disyston". Besides that, we could also detect the active metabolites of the last three insecticides. After 3 days of spraying small cotton plants with a commercial formulation of "Systox", we get positive results with the two principal plant metabolites of this insecticide, evidently the sulfone derivatives of the "thiol" and "thiono" isomers of Systox according the studies of Fukuto, Metcalf, March and Maxon. In the same way, in cotton plants whose seeds were treated with commercial charcoal formulation of "Thimet" and "Disyston" at 2% of active ingridient, we detect very clearly 3 metabolites in the "Disyston" and 2 in the "Thimet" treatments after 18 days and using the extract of 1 f of leaves; after 45 days, using the extracts of 5 g of leaves, still we could detect 2 metabolites in the "Disyston" treated plants and negative test from those treated with "Thimet". These metabolites, that are evidently the sulfoxide and sulfone derivatives

of the above referred insecticides, could not be detect by the processes elaborated by Coock and Otter.

It appears, therefore, that the method can be helpful in the biochemical and residual studies of this group of insecticides, and when other very efficient, but more expensive processes, as the use of isotopes, can't be used.

BIBLIOGRAFIA

1 — Cook, J. W. — 1954 — Paper Chromatography of some organic phosphate insecticides. I. New sopt test — *Jour. Assoc. of Off. Agr. Chem.*, **37**: 984-987.

2 — Fukuto, T. R., R. L. Metcalf, R. B. March & Marion J. Maxon — 1955 — Chemical behavior of "Systox" isomers in biological systems — *Jour. Econ. Ent.*, **48**: 347-354.

3 — March, R. B., R. L. Metcalf & T. R. Fukuto — 1954 — Paper Chromatography of the Systemic Insecticides, Demeton and Schradan. *Agr. Food Chem.*, **2**: 732.

4 — Metcalf, R. L. & R. B. March — 1953 — Reversed Phase Paper Chromatography of Parathion and Related Phosphate Esters. *Science*, **117**: 527-528.

5 — Metcalf, R. L., T. R. Fukuto & R. B. March — 1957 — Plant metabolism of Dithio-systox and Thimet. *Jour. Econ. Ent.*, **50**: 338-345:

6 — Otter, I. K. H. — 1955 — A general method for locating the spots on a paper cromatogram for tertiary alkyl phosphates, thiolophosphates and thionophosphates — *Nature*, **176**: 1078.

Vol. 26 — Artigo 15 Dezembro de 1959

OS MÉTODOS DE KJELDAHL E DUMAS NA DOSAGEM DOS DEFENSIVOS AGRÍCOLAS NITROGENADOS(*)

POR

N. F. Almeida e J. R. Piedade

Do Instituto Biológico de São Paulo

Com uma tabela no texto

CONSIDERAÇÕES GERAIS

O variado número de compostos nitrogenados empregados no combate às pragas da lavoura fêz com que nos empenhássemos em fazer uma revisão nos métodos analíticos já existentes, a fim de que pudéssemos eleger o mais conveniente às nossas necessidades de trabalho.

Os métodos colorimétricos atualmente em uso, embora forneçam resultados altamente satisfatórios do ponto de vista da precisão, baseando-se, entretanto, em reações específicas, apresentam os inconvenientes já por demais conhecidos dos que necessitam empregar um método geral para atender à análise de produtos que diferem extremamente em suas fórmulas estruturais.

Assim sendo, a solução mais viável seria a determinação do nitrogênio orgânico pelos processos clássicos de KJELDAHL & DUMAS, que são os mais difundidos na análise do nitrogênio em substâncias orgânicas.

O primeiro, introduzido pelo químico norueguês J. KJELDAHL e usado na maioria dos laboratórios, baseia-se, em linhas gerais, na transformação do nitrogênio orgânico em sulfato de amôneo, o qual fortemente alcalinizado libera amônea, que é posteriormente dosada alcalinimètricamente.

Quanto ao segundo, funda-se na transformação do nitrogênio orgânico, por meio do óxido cúprico, em nitrogênio elementar, o qual é por sua vez medido volumètricamente.

MÉTODO DE KJELDAHL

Princípio do método de Kjeldahl

Resumidamente, consiste na decomposição da substância orgânica com ácido sulfúrico conc., o qual oxida a matéria orgânica e con-

(*) Recebido para publicação em 11 de setembro de 1959.

verte o nitrogênio em sulfato de amôneo, conforme nos mostra a equação (a), na qual R representa o resíduo orgânico contendo carbono, hidrogênio, etc. (*2*)

$$(a)\quad RNH_2 + H_2SO_4 \rightarrow CO_2 + (NH_4)_2SO_4 + H_2O\,.$$

A solução fortemente ácida é, então, diluida e a amônea liberada pela adição de hidróxido de sódio em excesso (b)

$$(b)\quad (NH_4)_2SO_4 + 2NaOH \rightarrow 2NH_3 + Na_2SO_4\,.$$

A amônea, separada da solução por meio de destilação, é absorvida num frasco contendo, em excesso, uma solução titulada de ácido sulfúrico, de acôrdo com a equação (c)

$$(c)\quad 2NH_3 + H_2SO_4 \rightarrow (NH_4)_2SO_4$$

O excesso de ácido é então titulado com uma solução padrão de hidróxido de sódio.

Descrição da técnica empregada

Pesar uma quantidade de amostra correspondente a mais ou menos 0,07 g de nitrogênio em um papel de filtro de 11 cm de diâmetro que é dobrado cuidadosamente e introduzido num Kjeldahl de 500 ml. Pode-se, entretanto, substituir, com vantagem, o uso de papel de filtro, efetuando-se a pesagem em uma pequena cápsula de vidro que é depois colocada no balão.

Adicionar 0,5 g de sulfato de cobre anidro (ou 0,7 g de mercúrio, ou ainda 0,2 g de selênio pulverizado) (*12*). Kolthoff & Sandell (*5*) recomendam o uso de óxido mercúrico como catalizador. Esclarecem, entretanto, que em seu lugar pode ser usado o sulfato de cobre anidro.

Realmente, o emprêgo do sulfato de cobre parece ser mais prático, porquanto evita a necessidade de uma posterior adição de sulfeto de potássio, a fim de precipitar o mercúrio na forma de sulfeto mercúrico. Outros autores, contudo, tais como, Caron & Raquet optam pelo emprêgo de catalizadores redutores em lugar de oxidantes. Todavia, verificamos, através de várias determinações, que os resultados obtidos são comparáveis.

Quanto ao selênio e seus compostos, como catalizadores, devemos salientar que, devido à sua extrema volatilidade e toxidez, seu uso não apresenta vantagem sôbre os demais sais usados para o mesmo fim (*2*).

Juntamente com a adição do sulfato de cobre, introduzir 7 a 10 g de sulfato de potássio (ou de sódio), cuja finalidade inicial é aumentar o ponto de ebulição da mistura e, posteriormente, auxiliar a oxidação.

Feito isto, adicionar ao balão 20 ml de ácido sulfúrico conc., tendo-se o cuidado de que a amostra seja molhada totalmente pelo ácido antes de ser aquecida. A seguir adaptar o balão a um suporte, de modo que permaneça num ângulo de 45º.

A fim de evitar possíveis perdas da substância nitrogenada, o aquecimento deve ser iniciado com uma chama pequena e assim mantida até que cesse a formação de espuma, após esta fase, aumentá-la, porém evitando ebulição violenta (*13*).

Depois do aparecimento de vapores brancos, densos, provenientes da destilação do ácido sulfúrico, tapar a bôca do balão com um pequeno funil de extremidade fechada ou com uma bola de vidro pediculada. Esta técnica tem por finalidade facilitar a condensação dos vapores sulfúricos despreendidos pelo aquecimento.

A digestão deve ser mantida até que o líquido, que no início é escuro, torne-se completamente incolor ou esverdeado, no caso de se usar o sulfato de cobre como catalizador.

O tempo necessário para que a digestão se complete é variável de acôrdo com a natureza da substância a ser analisada, em geral é de 1 a 6 horas.

Ao fim da digestão, recomenda-se ainda um aquecimento adicional de 30 minutos. Ao término da mesma, o líquido se transformará, após o resfriamento, em uma massa sólida, a qual é dissolvida pela adição de 200 ml de água destilada.

No caso de haver sido usado mercúrio ou óxido mercúrico como catalizador, torna-se necessária a adição de 20 ml de uma solução a 5% de sulfeto de potássio, a fim de precipitá-lo na forma de sulfeto mercúrico.

Em seguida, adicionar cuidadosamente 80 ml de uma solução de hidróxido de sódio a 50%, de modo tal que, escorrendo pelas paredes internas do balão, forme uma camada por baixo da solução ácida (*15*). Imediatamente após a adição da soda, juntar 1 g de zinco granulado, que permitirá uma ebulição branda e regular.

Feito isto, adaptar ràpidamente o balão a um refrigerador, cuja extremidade deve estar ligada a uma pipeta do tipo Michel, a qual tem por função impedir a ascenção do ácido por sucção. Esta deve ter sua extremidade submergida em um Erlenmeyer de 250 ml, contendo 30 ml de uma solução de ácido sulfúrico 1,0 N e água necessária para cobrir a ponta da pipeta. Todavia, logo que se inicie a passagem de vapor de água, já não é necesário que a extremidade daquela fique mergulhada no líquido.

E' importante que entre o balão e o refrigerador se interponha uma válvula de segurança para prevenir que gotículas de álcali atinjam o frasco receptor.

Iniciar a destilação agitando primeiramente o conteúdo do frasco com um movimento de rotação para que as duas camadas se misturem. Aquecer ràpidamente a solução contida no Kjeldahl até a ebulição e então, ajustar a chama para que essa ebulição seja contínua, mas não demasiado rápida.

Continuar a destilação até que 2/3 do líquido, no balão, tenha destilado. Retirar o Erlenmeyer, adicionar à solução algumas gôtas de vermelho de metila e titular o excesso de ácido na solução com hidróxido de sódio 1,0 N.

Nota: Desde que vapores de amônea são comuns na maioria dos laboratórios, não raro acontece que os reagentes empregados e, principalmente o ácido sulfúrico, estejam dêles impregnados, o que iria provocar resultados

altos nas determinações a serem efetuadas. Daí a necessidade de se proceder a um ensaio em branco para efeito de correção.

Desnecessário será recomendar que, durante as análises, deve-se evitar a abertura de frascos de amônea, bem como qualquer manipulação que envolva o emprêgo dêsse reagente.

Cálculo

1 ml de H_2SO_4 1,0 N $\rightarrow$ 0,014 g de nitrogênio

$$\frac{(A - B) \times 0{,}014 \times 100}{P.\ A.} = \%\ \text{de nitrogênio na amostra}$$

A = ml de H_2SO_4 1,0 N gastos para a amostra

B = ml de " " " " " o branco

P. A. = pêso da amostra

Resultados

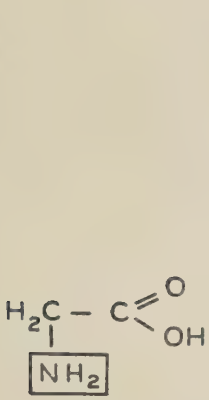
Inicialmente, com o intuito de comprovarmos a técnica descrita, recorremos à dosagem do ácido amino-acético (glicocola), pois, tratando-se de um composto puro, era bastante indicado para essa verificação, uma vez que a maioria dos produtos técnicos de defensivos agrícolas apresenta uma concentração que varia de 90-99%.

Os resultados foram altamente satisfatórios, pois possuindo a glicocola um teor de 18,86% em nitrogênio amínico, foram obtidos, nas duas análises efetuadas, resultados de 18,82% e 18,78%.

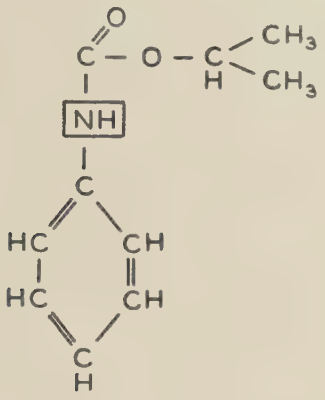
Uma vez verificada a eficiência da técnica, passamos a aplicá-la a alguns dos inúmeros produtos nitrogenados destinados a fins agrícolas.

O primeiro dêles a ser analisado foi o fenil carbamato isopropílico (IPC-ervicida) que, possuindo teòricamente 7,82% de nitrogênio amínico, apresentou os seguintes resultados: 7,50% e 7,60%. Deve-se considerar, entretanto, que a referida amostra era de um produto técnico e, como tal, de pureza não absoluta.

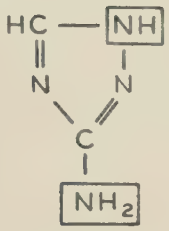
O segundo produto submetido à análise foi uma amostra de aminotriazol (ervicida) quìmicamente puro, cujo teor em nitrogênio é de 66,66%. Os resultados obtidos foram de 33,24% e 33,18%, correspondentes pràticamente à metade da porcentagem teórica de nitrogênio, o que nos levou a supor que, tal como na glicocola e no IPC, apenas os nitrogênios hidrogenados foram transformados em amônea.



Glicocola

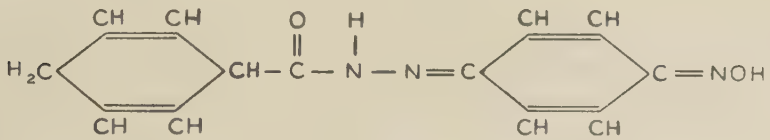


IPC



Aminotriazol

Tentamos, a seguir, a análise da quinonoximabenzoil-hidrazona (Neantox-fungicida). Êste composto, todavia, não foi suscetível de dosagem pelo método de Kjeldahl, porquanto, volatilizando-se durante a digestão e sublimando-se no colo do balão, apresentou resultados baixos e até nulos.



Neantox

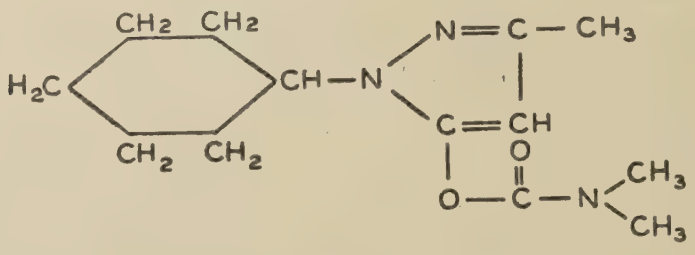
O mesmo foi observado por Margosches & Kristen (7) ao analisarem alguns compostos orgânicos nitrogenados.

Finalmente, efetuamos a determinação do 5-dimetil-carbamato de 3-metil-1-fenilpirazolil (Pyrolan-aficida), produto técnico com um teor em nitrogênio de 16,28%. Os resultados foram de 14,20% e 14,28%.

Todavia, é necessário que se atente não ser o método de Kjeldahl específico para todos os compostos heterocíclicos nitrogenados, o que explica os teores baixos acima apresentados. Também não se adapta êste processo à determinação de compostos cujo nitrogênio se encontra em grupamentos nitro (NO_2), nitroso (NO) e azo (N = N).

Segundo Vogel (*14*), o presente método é, na maioria dos casos, aplicável sòmente à dosagem do nitrogênio em grupamentos amínicos e amídicos. Os outros grupamentos nitrogenados são geralmente refratários e requerem um tratamento especial para converter o nitrogênio a uma forma mais fàcilmente reduzível antes da digestão com ácido sulfúrico (*9*). Êsse tratamento consiste em reduzir à forma amínica as diferentes funções orgânicas nitrogenadas.

Diversos são os processos de redução indicados para tal fim. Dentre êles, escolhemos inicialmente o proposto por Sisley & David (*11*), que é baseado no poder redutor do hidrossulfito de sódio. Empregâmo-lo para o doseamento do aminotriazol, do neantox e de dois compostos nitrados, que foram o dinitro-ciclo-hexil-fenol e o paranitrofenol.



Pyrolan

No primeiro caso, verificamos não ter havido redução, pois os resultados foram idênticos aos anteriores, quando o produto não foi submetido a êsse tratamento. O neantox apesar da redução voltou a volatilizar, o mesmo sucedendo com os dois nitrados.

O segundo processo de redução a ser usado foi o de Eckert (*1*), que se funda nas propriedades redutoras do SO_2, obtido através da reação do ácido sulfúrico fumegante sôbre o enxôfre. Os mesmos compostos foram utilizados e os resultados obtidos foram semelhantes aos anteriores.

Outro tipo de redução, bastante aconselhável, consiste em submeter o composto orgânico a um tratamento preliminar com ácido iodídrico e fósforo vermelho (*8*).

$$RNO_2 + 6HI + 2P \rightarrow RNH_2 + 2H_2O + 2PI_3$$

O fósforo vermelho tem uma função catalítica, pois mantém uma alta concentração de HI na reação.

$$PI_3 + 3H_2O \rightarrow 3HI + H_3PO_3$$

O processo, apesar de bem fundamentado, não apresentou, todavia, resultados satisfatórios.

Utilizamos, por fim, o método descrito por JOLDBAUER (*4*), que nos pareceu mais prático, porquanto, a redução e a digestão são efetuadas simultâneamente. Os resultados foram, entretanto, mais uma vez insatisfatórios. Contudo, devemos salientar que os compostos por nós submetidos a êsses tipos de redução, com excessão feita ao aminotriazol, volatilizaram-se durante os tratamentos efetuados, o que explica o insucesso dos vários processos acima descritos.

Quanto ao aminotriazol, embora não seja uma substância volátil, deduzimos que se trata de um daquêles compostos heterocíclicos nitrogenados não suscetíveis de redução.

Do exposto, conclui-se que o método de KJELDAHL só se revelou satisfatório na dosagem do fenil-carbamato-isopropílico e do aminotriazol (nitrogênio parcial), o que nos levou então, a tentar a determinação dos outros compostos pelo método de Dumas.

MÉTODO DE DUMAS

Princípio do método de Dumas

Êste método consiste na destruição do composto orgânico pelo calor, numa atmosfera de gás carbônico, usando-se, ainda, o óxido cúprico como agente oxidante.

Os óxidos de nitrogênio, produzidos durante a combustão, são reduzidos a nitrogênio elementar pela reação com o cobre metálico aquecido ao rubro (*3*).

O nitrogênio é finalmente recolhido em um nitrómetro, contendo uma solução de potassa a 70%, que se destina a absorver os outros produtos da combustão, tais como: CO_2, SO_2, H_2O e halogêneos.

Descrição da técnica empregada

Para o doseamento é necessário o seguinte material: um tubo de quartzo devidamente preparado, onde a substância é destruída; um nitrómetro para recolher e medir o nitrogênio despreendido; um aparelho de Kipp para produzir CO_2 e um forno elétrico que atinja a temperatura de 750° C.

PREPARAÇÃO DO TUBO DE QUARTZO: Em um tubo de quartzo de 60 cm de comprimento, diâmetro interno de 10 mm e externo de 13 mm, juntar:

a) Um pequeno fio de prata, cuja finalidade é reter os halogêneos resultantes da combustão da matéria orgânica.

b) Uma camada de 2 a 3 cm de amianto, isento de matéria orgânica.

c) 12 cm de uma camada de CuO grosso(*).

d) 6 cm " " " " " fino.

e) 10 cm " " " " " grosso.

f) 2 cm de amianto.

No tubo assim preparado, passar uma corrente de hidrogênio (obtido através de um aparelho de Kipp, pela reação de HCl 1:3, sôbre zinco metálico), a fim de expulsar o ar e a água que se forma na reação. Entretanto, antes de atingir o tubo, a corrente de hidrogênio deverá passar por dois frascos lavadores contendo, respectivamente, água e uma solução alcalina de $KMnO_4$ 0,1 N, com o propósito de eliminar traços de arsênio que porventura a impurifiquem.

Depois de ser verificada a inexistência de ar no interior do tubo, continuar a passagem de hidrogênio e aquecer a camada fina de CuO com uma chama oxidante a fim de reduzir o CuO a cobre metálico. A operação termina quando o cobre ficar vermelho a frio.

Finalmente, secar o tubo no forno elétrico, passando simultâneamente uma corrente de CO_2. Essa camada constitui a chamada parte fixa do tubo de combustão e pode ser utilizada em sete determinações.

Nitrómetro: O nitrómetro pode ser feito com uma micro-bureta graduada em centésimos de ml, tendo na sua extremidade superior uma torneira e um pequeno reservatório, cuja função é assegurar que um excesso de álcali forme um sêlo líquido acima da micro-bureta.

A extremidade inferior apresenta dois tubos laterais, sendo o superior, ligado por meio de um tubo de borracha e uma ampola de vidro contendo uma solução de KOH a 70% e, o inferior, que é também provido de uma torneira, ao tubo de combustão.

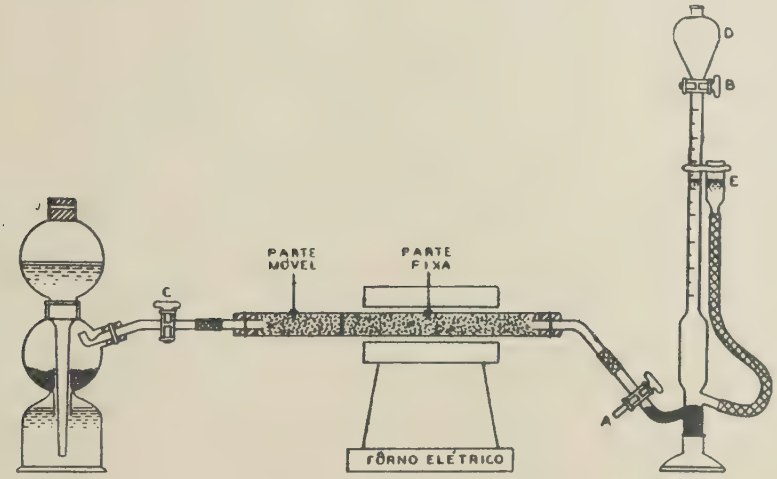
Ao nitrómetro é ainda introduzido, através de seu reservatório, uma quantidade de mercúrio que chegue quase a atingir o tubo lateral superior, sendo sua função de simples válvula controladora do borbulhamento de nitrogênio.

Aparelho de Kipp: Êste aparelho é carregado com pequenos pedaços de mármore e uma solução de HCl 1:3, para produzir CO_2.

(*) Aquecer ao rubro durante 15 minutos duas capsulas de ferro, contendo uma delas, óxido de cobre grosso (CuO em bastonetes) e outra, óxido de cobre fino (CuO triturado), a fim de assegurar-se uma perfeita oxidação do material. Após o aquecimento, deixar esfriar à temperatura ambiente.

Forno elétrico: O forno deve ter um comprimento de 25 cm e um diâmetro interno de 20 mm, sendo que sua capacidade de aquecimento deverá atingir 750° C.

Fig. I — Aparelho de Dumas



Técnica: Em um pesa-filtro de 4 cm de altura e 2 cm de diâmetro, que contém 1/3 de seu volume de CuO fino, pesar uma quantidade de amostra que forneça pela combustão cêrca de 3 ml de nitrogênio.(*)

Efetuada a pesagem, juntar sôbre a amostra mais uma porção de CuO fino, tapar o pesa-filtro e agitar para que haja uma perfeita mistura da amostra com o óxido cúprico.

A seguir, colocar o tubo de quartzo contendo sua parte fixa já prèviamente preparada em posição vertical e, com o auxílio de um funil sem colo, adicionar uma camada de 7 cm de CuO grosso e mais 0,5 cm de CuO fino.

O conteúdo do pesa-filtro é então transferido para o tubo e aquêle é "lavado" sucessivamente com duas a três porções de CuO fino. Adicionar mais 4 cm de uma camada de CuO grosso e, finalmente, fechar o tubo com um tampão de amianto, prèviamente queimado em chama oxidante, a fim de eliminar qualquer substância orgânica que possa existir como impureza.

Colocar o tubo no forno elétrico, adaptando a extremidade correspondente à parte fixa ao nitrómetro e a correspondente à parte móvel, mais substância, ao gerador de CO_2.

Antes de se iniciar a combustão, o ar deve ser expulso do tubo. Para isto, abrir a torneira *C* do gerador de CO_2, bem como a *A* e *B* e deixar

---

(*) Ex.: Aminotriazol: Pêso molecular 84. Número de átomos de nitrogênio na molécula 4. Nas condições normais de pressão e temperatura (760 mm Hg e 0° C), 1 mol de nitrogênio ocupa um volume de 22,4 l ou 22.400 ml

44.800 ml ———— (4N) 84

3 ml ———— X 0,00615 g de amostra.

passar uma corrente de CO_2, durante 10 minutos. A fim de verificar se todo o ar foi expulso, fechar as torneiras *A, B* e *C,* elevar o nível da solução de potassa até a parte superior da bureta e, ao fazer circular novamente CO_2, verificar se as bolhas despreendidas são totalmente absorvidas. Caso contrário, passar mais CO_2 até que haja completa absorção das mesmas.

Uma vez comprovada a inexistência de ar no interior do tubo, fechar as torneiras *A* e *C* e elevar o nível da solução de potassa até mais ou menos a metade do reservatório superior da bureta.

Feito isto, abrir a torneira *A* e ligar o forno, aquecendo a parte fixa por 20 minutos. Iniciar, então, a combustão pròpriamente dita, efetuando o aquecimento do tubo por meio de um bico de Bunsen, da extremidade ligada ao gerador de CO_2 em direção ao forno.

A partir dêsse momento, o nitrogênio começa a despreender-se e, borbulhando na solução de KOH, vai se alojar na parte superior da bureta. Quando cessar o despreendimento de nitrogênio, passar uma corrente moderada de CO_2 e regular a torneira *A* de tal modo que o borbulhamento do nitrogênio, ainda existente no tubo, não seja demasiado rápido.

A operação termina com o aparecimento de micro-bolhas de CO_2, que são absorvidas pela solução de KOH.

Quinze minutos após o término da análise, efetuar a leitura do volume de nitrogênio despreendido, colocando na mesma altura os níveis da solução de KOH na ampola *E* e no nitrómetro. Anotar também a temperatura e pressão do meio ambiente.

Cálculo

O cálculo apresentado pelos vários compêndios de Química Analítica é geralmente complexo, em virtude de ter que se levar em consideração, a tensão de vapor da solução de potassa. Entretanto, como na concentração por nós indicada essa tensão é pràticamente nula, o cálculo pode ser bastante simplificado empregando-se a fórmula abaixo:

$$\% \text{ de nitrogênio} = \frac{X \times V \times 100}{P.\ A.}$$

Onde:

X = pêso de 1 ml de nitrogênio na temperatura e pressão em que foi efetuada a análise. Êste valor é obtido de tabelas que dão o logarítmo do pêso de 1 ml de nitrogênio, nas diferentes condições de pressão e temperatura (*6* e *10*).

V = volume de nitrogênio encontrado.

PA = pêso de amostra.

Resultados:

Submetemos ao método de DUMAS, apenas aquêles produtos não dosáveis pelo método de KJELDAHL, quer por se tratarem de compostos voláteis, quer ainda, por serem compostos heterocíclicos não dosáveis pelo referido processo.

Evidentemente, não efetuamos a determinação de compostos amínicos e amídicos, pois êstes são dosáveis por ambos os métodos.

Pela tabela abaixo, poderá ser verificado que os resultados foram altamente satisfatórios, evidenciando-se o método de DUMAS de uma grande segurança para a determinação de qualquer grupamento orgânico nitrogenado.

TABELA I

RESULTADOS OBTIDOS

Produtos	% em Nitrogênio teórico	Método de Kjeldahl	Método de Dumas
Paranitrofenol — 90-99%	9,06-9,96%	—	9,25%
Aminotriazol — 100%	66,66%	33,21%	67,00%
Dinitrociclo-hexilfenol — 100%	9,85%	—	9,83%
Quinonoxima-benzoilhidra-zona — 90-99%	15,55-17,10%	—	15,31%

NOTA: Cada resultado representa a média aritmética de 3 determinações.

SUMÁRIO

Vários defensivos agrícolas nitrogenados foram analisados, baseando-se a sua determinação na dosagem do nitrogênio elementar.

Lançando mão dos métodos clássicos de KJELDAHL e de DUMAS, que são os mais freqüentemente empregados nos laboratórios científicos, foi estabelecida a parte técnica de uma maneira simples e segura, que é descrita em seus mínimos detalhes.

Quatro produtos, paranitrofenol, aminotriazol, dinitrociclohexifenol e quinonoximabenzoilhidrazona, contendo nitrogênio em diferentes grupamentos orgânicos foram submetidos aos dois processos. Pelos resultados obtidos (tabela I), conclui-se ser o método de DUMAS, o mais aconselhável.

O método de KJELDAHL foi empregado com sucesso na determinação do fenil-carbamato-isopropílico e do aminotriazol (nitrogênio parcial). Deve-se observar, todavia, a sua não especificidade a todos os compostos heterocíclicos nitrogenados. Além dêsses, não se adapta também o referido processo à determinação de compostos cujo nitrogênio se encontra em grupamentos nitro, nitroso e azo. Êsses

grupamentos são, via de regra, refratários e requerem um tratamento especial para converter o nitrogênio que contêm à forma amínica.

KJELDAHL AND DUMAS METHODS FOR THE ANALYSIS OF NITROGEN CONTAINING PESTICIDES

Abstract

Several nitrogenous pesticides for agricultural use were analysed, according to the elementary nitrogen determination.

The well known methods devised by Kjeldahl and Dumas for the quantitative determination of nitrogen ir organic compounds were applied for the determination of nitrogenous pesticides. The conventional procedure, as advised by Kjeldahl and Dumas, and which is currently used, was followed. A simple and safe technique is described in detail.

Four products, p-nitrophenol, aminotriazole, dinitrocyclohexilphenol and quinoneoximebenzoylhydrazone, containing nitrogen in different radicals were submited to these methods.

The results (table 1) show Dumas methods to be most reliable. On the other hand, the Kjeldahl method which can be used in some cases, is not specific for all of the heterocyclic nitrogen compounds.

Furthermore, the process is not suitable for the determination of compounds whose nitrogen be in the nitro, nitrous and azo groups. These groups, are, generally, refractary and demand a special treatment in order to have their nitrogen converted into the aminic form.

Kjeldahl method, was successfully employed to determine isopropyl N-phenyl-carbamate and aminotriazole (partial nitrogen).

BIBLIOGRAFIA

1 — Eckert *in* Meyer, H. — 1931 — Analyse und Konstitutionsermittlung organischer Verbindungen — pág. 129 — Verlag von Julius Springer, Berlin.

2 — Foulk, C. W., Moyer, H. V. & Mac Nevin, W. M. — 1952 — Quantitative Chemical Analysis — pág. 343, 345. — Mac Graw — Hill Book Co., Inc., New York.

3 — Gattermann, L. — 1927 — Práticas de Química Orgânica — pág. 59 — Manuel Marín, Barcelona.

4 — Joldbauer in Treadwell, F. P. — 1950 — Tratado de Química Analítica, tomo II, 6.ª Edição espanhola — pág. 55 — Manuel Marín Editor, Buenos Aires.

5 — Kolthoff, I. M. & Sandell, E. B. — 1952 — Textbook of Quantitative Inorganic Analysis — pág. 538 — The Mac Millan Co., New York.

6 — Küster, F. W. — 1929 — Logarithmische Rechentafeln für Chemiker — pág. 60 — Walter de Gruyter & Co., Berlin.

7 — Margosches & Kristen *in* Mitchell, J., Kolthoff, I. M., Proskaner, E. S. & Weissberger, A. — 1954 — Organic Analysis, vol. II — pág. 81 — Interscience Publishers, Inc., New York.

8 — Maugeney, G. — 1951 — Les Methodes Semi-micro dans l'Analyse Organique Quantitative — pág. 67 — Dunod, Paris.

9 — Mitchell, J., Kolthoff, I. M., Proskaner, E. S. & Weissberger, A. — 1956 — Organic Analysis, vol. III — pág. 137 — Interscience Publishers, Inc., New York.

10 — Niederl, J. B. & Neiderl, V. — 1938 — Organic Quantitative Micro Analysis — pág. 59 — John Wiley and Sons, London.

11 — Sisley & David *in* Caron, H. & Raquet, D. — 1947 — Analyse Chimique Quantitative — pág. 55 — Librairie Vuibert, Paris.

12 — Sutton, F. — 1955 — Sutton's Volumetric Analysis — pág. 143 — Butterworths Scientific Publications, London.

13 — Treadwell, F. P. — 1950 — Tratado de Química Analítica, tomo II, 6.ª edição espanhola — pág. 55 — Manuel Marín Editor, Buenos Aires.

14 — Vogel, I. A. — 1958 — Elementary Practical Organic Chemistry — pág. 653 — Longmans, Green and Co., London.

15 — Wood, H. C. & Osol, A. — 1943 — The Dispensatory of the United States of America, 23.ª edição — pág. 1607 — J. B. Lippincott Co., Philadelphia.

Vol. 26 — Artigo 16 Dezembro de 1959

TRATAMENTO DE TUBÉRCULOS DE BATATINHA COM INSETICIDAS SISTÊMICOS PARA O CONTRÔLE DE PULGÕES (*HOMOPTERA; APHIDIDAE*)(*)

POR

Antonietta Pigatti e A. Orlando

Do Instituto Biológico de São Paulo

Com 2 tabelas no texto

INTRODUÇÃO

Entre nós é amplamente recomendado o tratamento das sementes de algodão, antes do plantio, com inseticidas sistêmicos, para controlar algumas pragas iniciais dessa cultura (*1, 3*). Nesse mesmo sentido, algumas experiências têm sido realizadas também em outras culturas, com resultados animadores.

No presente ensaio, procuramos conhecer, primeiramente, a atividade de dois dos inseticidas sistêmicos mais recomendados para o tratamento de sementes (Thimet e Disiston) em tubérculos de batatinha, visando ao combate às principais espécies de pulgões que atacam essa cultura — *Myzus persicae* (SULZ.) e *Macrosiphum solanifolii* (ASH.). Determinada essa atividade, procuramos comparar o mais eficiente dêles com os inseticidas que são normalmente aplicados na parte aérea das plantas.

MATERIAL E TÉCNICA

1.º ENSAIO: *Plantio de tubérculos prèviamente tratados com sistêmicos, visando ao contrôle dos pulgões.*

Os tubérculos de batatinha foram tratados com inseticidas sistêmicos (Thimet e Disiston) adsorvidos em carvão ativado.

No delineamento experimental foi empregado o quadrado latino, com 3 tratamentos e 3 repetições, compreendendo 9 canteiros de 5 m por 2,5 m; cada canteiro conteve 3 linhas, espaçadas de 1 m, cada uma com 10 plantas distanciadas 50 cm uma da outra.

Cada metro de linha recebeu uma adubação química de 40 g de superfosfato, 60 g de sulfato de amônio e 20 g da cloreto de potássio.

Foi utilizada a variedade Tédria, fornecida pela Secção de Tubérculos do Instituto Agronômico de Campinas.

(*) Recebido para publicação em 17 de dezembro de 1959.

Os tratamentos foram os seguintes:

A — Thimet a 47% em carvão — 0,1% em relação ao pêso das sementes;
B — Disiston a 50% em carvão — 0,1% em relação ao pêso das sementes;
C — Testemunha, só carvão — 0,1% em relação ao pêso das sementes.

Para o tratamento, os tubérculos foram levemente umedecidos com água e muito bem agitados em cilindro giratório metálico, com o inseticida; depois do tratamento ficaram expostos ao ar livre, à sombra, por quatro dias e, em seguida, plantados.

As contagens dos pulgões foram iniciadas 15 dias depois do plantio e continuaram sendo feitas semanalmente. De cada vez eram tomadas 10 plantas, ao acaso, de cada canteiro, retirando delas uma fôlha superior e uma fôlha inferior e contado o número de afídios — *Myzus persicae* (Sulz.) e *Macrosiphum solanifolii* (Ash.).

Depois de cada contagem, tôdas as plantas foram pulverizadas com Dithane Z-78 na quantidade de 2,5 g por litro de água com a finalidade de prevenir o aparecimento de doenças fúngicas.

2.º Ensaio: *Eficiência comparativa entre os tratamentos inseticidas normais da parte aérea e a aplicação de sistêmico nos tubérculos antes do plantio, para o contrôle dos pulgões.*

De acôrdo com os resultados conseguidos no ensaio anterior, neste segundo experimento foi empregado o tratamento dos tubérculos com o sistêmico Disiston, que se apresentou como aficida de maior poder residual; e a atividade dêsse sistêmico foi comparada com os produtos recomendados para proteção da parte aérea.

O ensaio foi delineado em quadrado latino, com 4 tratamentos e 4 repetições; cada canteiro media 2 m por 2 m e os tubérculos foram plantados em 3 linhas espaçadas de 80 cm, com intervalo de 40 cm entre as plantas.

Foi utilizada a variedade IAC-2, fornecida pela Secção de Tubérculos do Instituto Agronômico de Campinas.

A adubação foi idêntica à do 1.º ensaio e os tratamentos usados foram:

A — Testemunha.
B — Disiston a 50% em carvão — 0,1% em relação ao pêso das sementes.
C — Paration, emulsão a 5% — 200 ml/100 l de água (ou 1/10.000 de princípio ativo).

D — Metasistox, emulsão a 50% — 200 ml/100 l de água ou 1/1.000 de princípio ativo).

No tratamento dos tubérculos com Disiston foi adotada a mesma técnica do 1.º ensaio, e plantados após 7 dias.

A contagem dos afídios sòmente pôde ser iniciada 40 dias depois de plantio, pois a infestação teve início nessa época. Cada vez eram tomadas ao acaso 5 plantas de cada canteiro e retiradas uma fôlha de cima e uma de baixo, anotando-se as infestações de *Myzus* e *Macrosiphum*.

As pulverizações da parte aérea das plantas, com o Dithane Z-78 e os inseticidas, foram sempre feitas depois das contagens do número de afídios.

RESULTADOS GERAIS

1.º Ensaio: Os resultados conseguidos no primeiro ensaio estão registrados na Tabela I.

TABELA I

Resultados obtidos com o tratamento dos tubérculos-sementes, antes do plantio, com inseticidas sistêmicos, para contrôle dos pulgões.

TRATAMENTOS	ESPÉCIE DE AFÍDIOS	NÚMERO(*) DE AFÍDIOS APÓS					
		21 dias	28 dias	36 dias	42 dias	49 dias	56 dias
Thimet	*Myzus*	0	0	13	8	13	23
	Macrosiphum	0	0	22	17	80	240
	TOTAL	0	0	35	25	93	263
Disiston	*Myzus*	0	0	0	14	13	4
	Macrosiphum	0	6	1	0	25	76
	TOTAL	0	6	1	14	38	80
Testemunha	*Myzus*	1	37	42	46	100	53
	Macrosiphum	9	23	91	208	350	461
	TOTAL	10	60	133	254	450	514

(*) Total em 60 fôlhas de 30 plantas.

Verificou-se que, de fato, os sistêmicos Disiston e Thimet, revelaram atividade contra os pulgões da batatinha, quando aplicados nos tubérculos, antes do plantio; o Disiston demonstrou possuir um poder residual um pouco mais prolongado que o Thimet.

2.º Ensaio: Na Tabela II estão resumidos os resultados obtidos com a comparação dos tratamentos normalmente indicados para a parte aérea, e o tratamento prévio dos tubérculos-sementes com o Disiston sistêmico que apresentou melhor resultado no 1.º ensaio.

TABELA II

Comparação da eficiência dos tratamentos, da parte aérea e dos tubérculos-sementes antes do plantio, no contrôle dos pulgões.

TRATAMENTOS	ESPÉCIE DE AFÍDIOS	NÚMERO(*) DE AFÍDIOS APÓS OS TRATAMENTOS	
		2 dias (em 6-XI-58)	9 dias (em 13-XI-58)
Testemunha	*Myzus*	255	521
	Macrosiphum	56	236
	TOTAL	311	757
Paration	*Myzus*	3	63
	Macrosiphum	4	3
	TOTAL	7	66
Metasistox	*Myzus*	0	24
	Macrosiphum	0	8
	TOTAL	0	32
Disiston	ESPÉCIE DE AFÍDIOS	NÚMERO DE AFÍDIOS APÓS O PLANTIO	
		44 dias (em 6-XI-58)	51 dias (em 13-XI-58)
	Myzus	4	58
	Macrosiphum	5	8
	TOTAL	9	66

(*) Total em 40 fôlhas de 20 plantas.

Verifica-se que o tratamento da parte aérea com o Paration, baseando-se nas contagens dos pulgões feitas após 2 e 9 dias da aplicação, ocasionou uma eficiência comparável a 44 e 51 dias, respectivamente, da apresentada pelo tratamento dos tubérculos com Disiston; nesse sentido, o Metasistox demonstrou atividade pouco superior.

ANÁLISE DE RESÍDUO DE INSETICIDAS NOS TUBÉRCULOS DE BATATA

Devido ao grande interêsse em saber se os sistêmicos Thimet e Disiston aplicados nos tubérculos, antes do plantio, e os inseticidas aplicados na parte aérea — Paration e o Metasistox — deixavam resíduos, foram feitos ensaios de determinações dêsses resíduos, usando a técnica de inibição da colinesterase.

Na cultura foram feitos 5 tratamentos com Paration e 3 com Metasistox, sendo as últimas aplicações, respectivamente, 56 e 63 dias antes da colheita.

O método de análise utilizado foi o de Giang & Hall (*4*), modificado por Hensel e colaboradores (*5*). Tratando-se de extrato de batata, que tem a propriedade de inibir a colinesterase "in vitro" (*6*), foi seguida a técnica indicada por Butler & Westlake (*2*).

Nos trabalhos mencionados, recomenda-se o plasma humano como fonte de colinesterase. Como não tivéssemos à nossa disposição êste material, foram feitos vários ensaios com plasma de boi, bezerro e cavalo e concluímos que o mais indicado para o caso seria o plasma de cavalo, pela facilidade de sua obtenção e pela atividade da colinesterase. Mesmo sendo menor a sua atividade que a do plasma humano (*7*) êste material se prestou bem para os nossos trabalhos.

Foram traçadas curvas padrões para o Thimet, Disiston, Paration e Metasistox.

Analisadas as amostras de batatas de cada tratamento, verificamos não haver em nenhuma delas a presença de inseticidas até a quantidade de 0,5 p.p.m. quantidade mínima que a sensibilidade do método permitiu constatar.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

De acôrdo com os resultados obtidos no 1.º e no 2.º ensaios do presente trabalho, constatamos que, de fato, a ação sistêmica dos inseticidas Disiston e Thimet se mostrou eficiente no contrôle de afídios, por período mais ou menos longo.

Verificamos, também, que os tratamentos da parte aérea com inseticidas normalmente empregados nessa cultura, como o Paration e o Metasistox, promoveram um contrôle de afídios bastante satisfatório.

Em vista dêsses resultados evidenciam-se as vantagens e as desvantagens para cada tipo de tratamento.

Com o tratamento dos tubérculos com inseticidas sistêmicos, antes do plantio, pode-se dispensar, por um período relativamente longo, o tratamento da parte aérea contra os afídios, independente dos fatores climáticos desfavoráveis.

Por outro lado, devemos lembrar que a cultura da batatinha exige, obrigatòriamente, pulverizações periódicas de fungicidas na parte aérea. Os produtos para isso recomendados são compatíveis com os inseticidas indicados para essa cultura; portanto êsses defensivos, podem ser aplicados concomitantemente, não acarretando acréscimo de trabalho.

Verificamos, nas tabelas I e II, que a eficiência dos sistêmicos aplicados nos tubérculos tem uma duração limitada, no máximo de 56 dias. Muitas vêzes, porém, infestações fortes de afídios aparecem sòmente depois dêsse período, quando a eficiência dos inseticidas já está diminuindo; a aplicação de inseticidas nos tubérculos, nesse caso, implicaria em perda de trabalho e de material. O mesmo não acontece com aplicações na folhagem, uma vez que só seriam feitas quando necessárias.

Outra desvantagem decorrente da aplicação de sistêmicos nos tubérculos é a redução na porcentagem de germinação. Em três ensaios realizados no campo, notamos uma média de redução de 4% para o Thimet e de 15% para o Disiston.

Como conseqüência da alta toxicidade de tais inseticidas, e pelo elevado teor de princípio ativo, também o seu manuseio se torna perigoso, sendo exigidas instalações adequadas e operários especializados para o tratamento dos tubérculos-sementes.

Em conclusão, achamos aconselhável a aplicação de inseticidas sistêmicos nos tubérculos de batatas antes do plantio, sòmente em casos especiais, como o de seleção de sementes em localidades onde haja grande disseminação de doenças causadas por vírus.

Quanto aos tratamentos da parte aérea, desaconselhamos as aplicações do inseticida sistêmico Metasistox na fase final da cultura. E' prudente, para evitar o problema de resíduo, interromper os tratamentos um mês antes da colheita.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao engenheiro agrônomo O. J. Boock, da Secção de Raízes e Tubérculos do Instituto Agronômico, o fornecimento dos tubérculos-sementes, empregados nesses ensaios; e aos engenheiros agrônomos, bolsistas da FAO, Emilio A. Baires, de Honduras e Samuel S. Cruz Fernandes, do Chile, os nossos agradecimentos pela colaboração prestada na contagem dos pulgões.

POTATO TUBER TREATMENTS WITH SYSTEMIC INSECTICIDES FOR APHID CONTROL (*HOMOPTERA; APHIDIDAE*)

Abstract

In this paper the authors present the data obtained in two series of experiments.

In the first one, commercial formulation of Thimet and Disyston, adsorbed in charcoal, were mixed with the potato tubers, at the dosage of 0.1% of its weight. The tubers were planted 4 days after the treatments.

In the second series, the Disyston treatment, that showed better results than Thimet, was compared with the common spray of the plants with Parathion at 0.01% and Metasystox at 0.1% of active ingredient.

The counts of the aphids were weekly made.

Disyston showed a residual effect of 56 days, and Thimet, of 49 days.

The population of the aphids, in the plots sprayed with Parathion, 2 and 9 days after the application, was approximately the same observed with Disyston treatment after 44 and 51 days, respectively. The same comparison made with Metasystox gave a little better result.

Both insecticides showed phytotoxicity effects. There were 4% and 15% of reduction in the potato tuber germination with the Thimet and Disyston treatments, respectively.

BIBLIOGRAFIA

1 — Almeida, P. R., O. Giannotti, O. S. Neves & E. S. Martinelli — 1957 — Ensaios sôbre o contrôle do Pulgão do algodoeiro (*Aphis gossypii* Glover), por meio de tratamento das sementes com inseticidas sistêmicos e pulverizações concentradas. *Biológico*, **23**: 145-156.

2 — Butler, Lillian I. & W. E. Westlake — 1957 — Demeton residues on fruits, vegetables and forage Crops. *J. Econ. Entom.*, **50**: 737-739.

3 — Fadigas Jr., M. S., O. Giannotti & P. R. Almeida — 1957 — O contrôle de algumas pragas iniciais do algodoeiro por meio de tratamento das sementes com novos tipos de inseticidas sistêmicos. *Biológico*, **23**: 227-236.

4 — Giang, P. A. & S. A. Hall — 1951 — Enzymatic determination of organic phosphorus insecticides. *Anal. Chem.*, **23**: 1830-1834.

5 — Hensel, J., A. E. Herwitt, V. M. Sheets & R. C. Scott — 1954 — Microestimation of demeton residues. Div. Agric. & Food Chemistry, 125 th meeting, Amer. Chem. Soc. Kansas City, Mo.

6 — Orgell, H., Kunda A. Vaidya & P. A. Dahm — 1958 — Inhibition of human plasma cholinesterase "in vitro" by Extracts of solanaceous plants. *Science*, **128**: 1136-1137.

7 — Whittaker, V. P. — 1951 — Specificity, mode of action and distribution of cholinesterases". *Physiol. Reviews.*, **31**: 312-343.

Vol. 26 — Artigo 17 Dezembro de 1959

ENSAIOS DE CONTRÔLE DA LAGARTA-RÔSCA — *AGROTIS YPSILON* (ROT.) — COM INSETICIDAS ORGÂNICOS MODERNOS. (*LEPIDOPTERA; NOCTUIDAE*)(*)

POR

Antonietta Pigatti

Do Instituto Biológico de São Paulo

Com 2 tabelas no texto e estampa 17

INTRODUÇÃO

As lagartas da mariposa *Agrotis ypsilon* (ROT.), conhecidas como lagartas-rôscas, pertencem ao grupo de pragas de solo que atacam muitas culturas, notadamente as de hortaliças, causando danos que variam de ano para ano (*2*).

Nestes últimos meses, pelo grande número de consultas dirigidas à Secção de Inseticidas, vindas de várias regiões do Estado, sôbre o modo de combater essa praga, verificamos que se tratava de um grande surto, causando graves prejuízos em várias culturas, principalmente às de tomateiro.

O inseticida que de forma geral tem sido recomendado para o contrôle dessa praga é o Aldrin; entretanto, de acôrdo com as informações que sempre acompanhavam as consultas, êsse produto não estava apresentando os resultados esperados. Assim, para esclarecer devidamente o problema, iniciamos, em laboratório, ensaios preliminares com vários inseticidas orgânicos modernos, visando selecionar os mais promissores que, posteriormente, foram aplicados no campo.

ENSAIOS DE LABORATÓRIO

Nestes ensaios foram usados de preferência os inseticidas mais indicados para o contrôle das pragas de solo.

(*) Entregue para publicação em 21 de dezembro de 1959.

A aplicação foi feita sob a forma de polvilhamento, usando-se a conhecida técnica de aplicação em câmara de polvilhamento a vacuo parcial, conforme descrição de Farrar e col. (*1*). Para cada aplicação foram usados 200 mg de inseticida em pó.

Dois tipos de ensaio de laboratório foram feitos:

a) Ação por contato;

b) Ação conjunta de contato e ingestão.

a) *Ação por contato*

Para êstes ensaios, usamos lagartas de tamanho médio, evitando as de primeiro e último estágios. Só eram aproveitadas quando permaneciam enroladas em forma de rôsca, ou quando se mostravam normalmente ativas (Estampa 17-A). Essas lagartas apresentam um canibalismo muito acentuado, havendo, portanto, necessidade de um certo cuidado no seu manuseio, devendo-se evitar o uso das que se apresentam feridas.

Para os tratamentos, 10 lagartas eram colocadas em uma caixa de Petri e levadas à câmara de polvilhamento, onde permaneciam por 10 minutos para receber tôda deposição do inseticida; como testemunha foi usado o talco puro.

A seguir, as mesmas eram retiradas cuidadosamente da câmara e colocadas em cubas de vidro com 10 cm de diâmetro por 10 cm de altura, contendo certa quantidade de mistura usada para alimentação de aves, à base de farelo, levemente umedecida com uma solução de água e açúcar mascavo. As lagartas, ali colocadas, imediatamente penetram no meio e não apresentam o inconveniente do canibalismo (Estampa 17-B).

Verificamos que, nessas condições, elas podem permanecer por vários dias, apresentando bom desenvolvimento e chegando a crisalidar, mesmo sem receber outra alimentação.

As observações dos resultados foram feitas depois de 24 e 48 horas da aplicação dos inseticidas e notamos que as mortas ou muito intoxicadas, permaneciam sempre na superfície da mistura de farelo. Os resultados estão resumidos na Tabela I.

TABELA I

Efeitos, por contato, de inseticidas orgânicos sôbre o mortalidade da Lagarta-rôsca *Agrotis ypsilon* (Rot.)

INSETICIDAS		Porcentagem de mortalidade após							
		24 Horas				48 Horas			
		1.a Série	2.a Série	3.a Série	Média	1.a Série	2.a Série	3.a Série	Média
Sevin	10 %	60	40	40	46,6	70	70	60	66,6
Rotane	10 %	40	10	20	23,3	40	20	40	33,3
DDT	10 %	30	30	30	30,0	30	30	50	36,6
Toxafeno	10 %	0	10	10	6,6	0	10	10	6,6
EPN	1 %	0	0	10	3,3	0	10	20	10,0
Aldrin	2,5%	0	10	—	5,0	0	30	—	15,0
Endrin	1,5%	20	0	—	10,0	20	10	—	15,0
Gusation	2 %	10	10	—	10,0	10	30	—	20,0
Lindane	2 %	10	10	—	10,0	20	30	—	25,0
Paration	1 %	20	20	—	20,0	20	20	—	20,0
Heptaclor	2,5%	25	—	—	25,0	25	—	—	25,0
Clordane	4 %	30	20	—	25,0	60	50	—	55,0
Clordane	10 %	50	—	—	50,0	50	—	—	50,0
Pirolan	5 %	25	—	—	25,0	50	—	—	50,0
Pirolan	10 %	75	—	—	75,0	85	—	—	85,0
Testemunha		0	0	10	3,3	20	0	10	10,0

b) *Ação conjunta de contato e ingestão*

Com os inseticidas selecionados de acôrdo com o ensaio anterior, fizemos testes simultâneos de contato e ingestão, visando avaliar a sua atividade nesse particular.

Para isso, na câmara de polvilhamento foram colocadas conjuntamente, fôlhas de couve e lagartas, recebendo ambas o mesmo tratamento. Em seguida, como no ensaio anterior, as lagartas eram retiradas e colocadas na mistura de farelo, onde logo se aprofundavam; na superfície dêste, foram colocadas as fôlhas de couve tratadas.

Estas experiências foram iniciadas sempre ao anoitecer, uma vez que as lagartas sòmente durante a noite vão à superfície da mistura de farelo para se alimentar. Foi êste o procedimento que acha-

mos mais viável a fim de que as lagartas se alimentassem das fôlhas tratadas.

Observações foram feitas nos dois dias seguintes, sempre pela manhã e os resultados estão resumidos na Tabela II.

TABELA II

Efeitos, por ingestão e por contato, de inseticidas orgânicos sôbre a Mortalidade da Lagarta-rôsca *Agrotis ypsilon* (Rot.)

INSETICIDAS	Porcentagem de mortalidade após	
	15 Horas	39 Horas
Sevin 10 %	40	80
Rotane 10 %	10	40
DDT 10 %	20	40
Aldrin 2,5%	0	10
Clordane 4 %	0	0
Testemunha	0	10

APLICAÇÕES NO CAMPO

Para comprovarmos os resultados obtidos nos ensaios de laboratório, foram feitas também aplicações no campo, onde os inseticidas foram utilizados em diversas áreas de cultura atacada pela praga e onde a sua eficiência foi simplesmente avaliada pelo número de plantas cortadas.

Tais experiências foram realizadas no Sítio Santo Agostinho, em Itapecerica da Serra, onde a infestação era muito intensa, causando danos totais em plantações de tomate, e prejudicando muito outras culturas, como batatinha, mandioquinha, milho híbrido, feijão de vagem, repolho e pimentão. De acôrdo com os ensaios preliminares os inseticidas usados foram: Sevin, Rotane, DDT e Clordane, em polvilhamentos sôbre o solo à razão de 12-15 kg/ha.

RESULTADOS GERAIS

De acôrdo com os resultados resumidos nas tabelas I e II e das observações de campo, podemos fazer as seguintes considerações

sôbre a eficiência dos vários inseticidas experimentados no contrôle da praga em questão.

O Sevin (1-naftil-N-metilcarbamato), inseticida de descoberta recente e que está sendo introduzido entre nós, foi o que apresentou melhores resultados, tanto nos experimentos de laboratório como nos de campo.

Nos ensaios de laboratório, as lagartas tratadas com Sevin não apresentaram nenhuma reação imediata, aprofundando-se na mistura de farelo tão logo ali eram colocadas. Passadas algumas horas, entretanto, elas voltavam a superfície, apresentando convulsões e tremores gerais, que iam se acentuando até a morte das mesmas; algumas se recuperavam, voltando novamente a penetrar na mistura de farelo completando o seu desenvolvimento. Nos ensaios por ingestão, a alimentação das lagartas foi muito reduzida.

No campo, o comportamento do Sevin foi excelente, pois obtivemos um contrôle total da praga, enquanto que, no laboratório, o máximo da mortalidade obtida foi de 80%.

O Rotane (DDD ou TDE) e o DDT, em laboratório produziram resultados semelhantes; no campo todavia, o Rotane se mostrou mais eficiente. O Clordane apresentou, em laboratório, um contrôle satisfatório, enquanto que a sua eficiência no campo foi muito reduzida.

O Aldrin, experimentado em laboratório, não teve ação alguma sôbre as lagartas, o que veio confirmar as numerosas observações já feitas, relativas à ineficiência dêsse inseticida no contrôle desta praga.

Ainda nos ensaios de laboratório, verificamos que as lagartas tratadas com E. P. N. e Toxafeno, tão logo recebiam o polvilhamento mostravam-se muito agitadas, com tremores gerais, locomovendo-se com rapidez; entretanto, passado algum tempo, todos êsses sintomas desapareciam e elas prosseguiam no seu desenvolvimento normal.

Os demais inseticidas experimentados, como Endrin, Gusation, Lindane, Paration e Heptaclor não se mostraram tóxicos para as lagartas. O Pirolan [carbamato de dimetil-5-(3-metil-1-fenilpirazolil)], incluído nos ensaios de laboratório por ser, como o Sevin, um carbamato, apresentou resultados contraditórios.

CONCLUSÃO

Dos inseticidas em pó, usados para o contrôle da lagarta-rôsca *A. ypsilon* (Rot.), em laboratório e no campo, podemos concluir que o mais eficiente foi o Sevin, seguindo-se o Rotane e o DDT, e por último o Clordane. Os demais inseticidas experimentados não mostraram efeitos tóxicos sôbre essa praga.

AGRADECIMENTOS

Consignamos nossos agradecimentos aos Srs. J. Pinto da Fonseca e C. M. Biezanko, pela determinação e confirmação dos exemplares de *A. ypsilon;* ao sr. Agostinho Tolese, proprietário do Sítio Santo Agostinho, pelas facilidades oferecidas às experiências de campo; e ao sr. Benjamin Muniz Medeiros, pelo auxílio prestado na coleta de lagartas e aplicações de inseticidas.

SCREEN TESTS WITH SEVERAL INSECTICIDES FOR THE CONTROL OF *AGROTIS YPSILON* (Rot.) (*LEPIDOPTERA; NOCTUIDAE*)

Abstract

In the State of S. Paulo, during 1959, several vegetable crops have been heavily infested by the black cutworm Agrotis ypsilon (Rot.). Tomatoes, potatoes and others were the most injuried crops.

The dusting with Aldrin 2.5%, which was the insecticide generally recomended for the control of this pest, failed completely to give any results.

In this paper are related tests conducted in laboratory and field conditions with several organic insecticides.

In laboratory, we have used the partial vacuum dusting for treating the insects according to the process described by Farrar and al.. In the field, the seleted insecticides from laboratory tests were applied in small areas of vegetable crops, and their efficiencies avaliated by estimating the number of cut plants.

The best results were obtained with Sevin 10%, following Rhothane (DDD) 10%, and finally DDT 10%.

The other insecticides, as: Aldrin 2.5%, Toxaphene 10%, E. P. N. 1%, Endrin 1.5%, Gusathion 2%, Lindane 2%, Parathion 1%, Heptachlor 2.5% and Chlordane 10%, in laboratory tests, gave negative results.

Pyrolan showed contraditory results.

BIBLIOGRAFIA

1 — Farrar, M. D., W. C. O'Kane & H. W. Smith — 1948 — Vacuum dusting of insects and plants. *Jour. Econ. Entom.* **41**: 647-648.

2 — Mariconi, F. A. M. — 1954 — A lagarta-rôsca. Pragas das plantas hortículas. *Biológico,* **20**: 41-46.

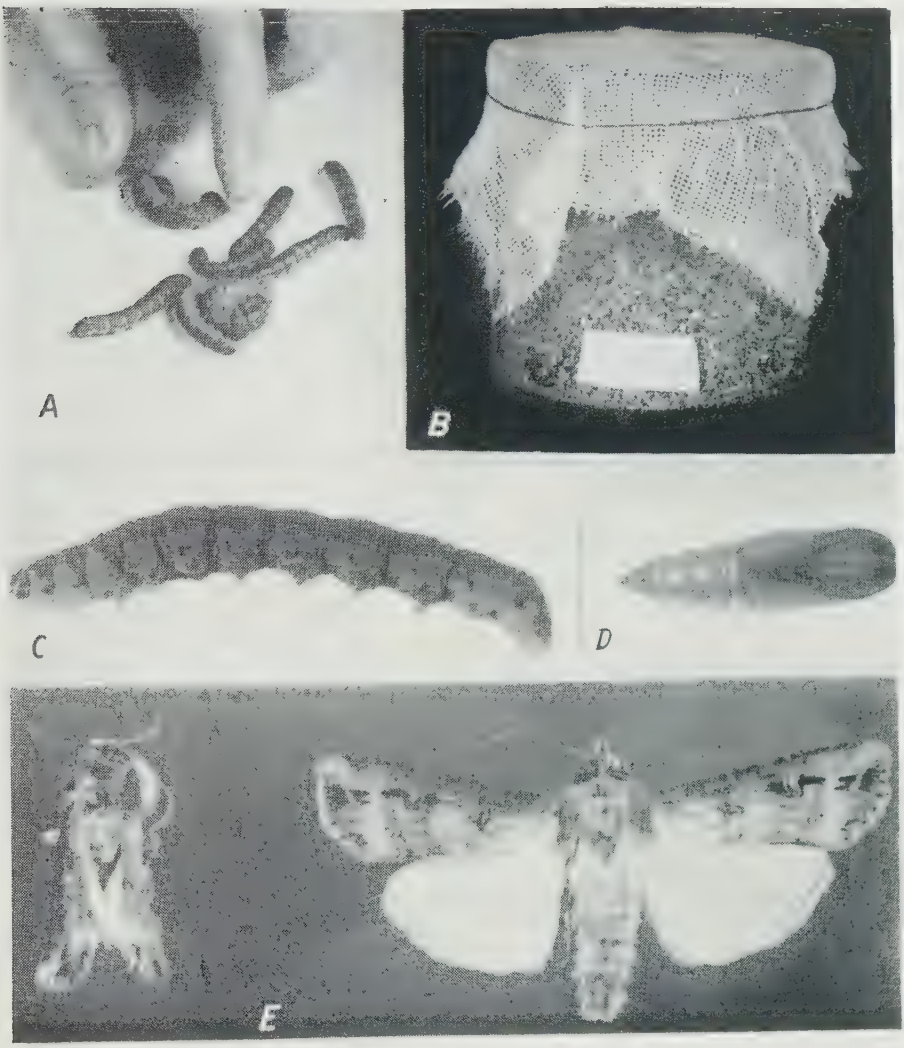


Fig. A — Lagartas selecionadas para os ensaios de laboratório.
Fig. B — Cuba de vidro, utilizada nos ensaios em laboratório.
Fig. C — Lagarta, no último estágio.
Fig. D — Crisálida.
Fig. E — Adultos de *Agrotis ypsilon* (Rot.).

Vol. 26 — Artigo 18 Dezembro de 1959

APLICAÇÃO DA REAÇÃO DE IMUNOADERÊNCIA À TIPIFICAÇÃO DO VÍRUS AFTOSO(*)

POR

Maria Brazil Esteves

Do Instituto Biológico de São Paulo

Com 5 tabelas no texto

O fenômeno da imunoaderência foi pela primeira vez observado por RIECKENBERG, em 1917 (*1*). Êste autor, estudando "in vitro" a ação de sôros específicos contra leptospiras, verificou a aderência de plaquetas quando estas eram acrescentadas ao sistema. Denominou êsse fenômeno de trombocitobarina.

Foram, no entanto, os trabalhos de NELSON (*2, 3*), que, a partir de 1952, deram maior desenvolvimento ao tema. Êste autor, trabalhando com diversos sistemas, estabeleceu as condições em que tal reação pode ser observada, salientou o papel do complemento, e deu a essa reação a denominação mais genérica de imunoaderência.

A simplicidade de execução da reação, ao lado de sua aparente especificidade e sensibilidade levaram-nos a tentar sua aplicação na tipificação do vírus aftoso.

Pareceu-nos de utilidade comparar os resultados obtidos pela reação de imunoaderência com os que se obtêm pela fixação de complemento, desde que, êste último é o método correntemente empregado na tipificação do vírus aftoso.

MATERIAL E TÉCNICA

SÔROS: Foram utilizados imune-sôros específicos anti-aftosos "A", "C" e "O", preparados em cobaias. Êsses sôros eram conservados a -30° C até o momento de serem usados.

ANTÍGENOS: Trabalhamos com dois tipos de antígenos: um preparado a partir de epitélio bovino infectado e outro proveniente de culturas de tecido. O primeiro foi preparado partindo-se de uma quantidade conhecida de epitélio bovino triturado em gral com areia e diluído a 1:5 em tampão barbiturato com Ca, Mg, e gelatina, centrifugado a 1500 r.p.m. durante 15 minutos e o sobrenadante tratado com clorofórmio (partes iguais) com agitação constante durante 30 minutos e novamente centrifugado a 2000 r.p.m. durante 20 minutos.

(*) Recebido para publicação em 28 de dezembro de 1959.

Em seguida o sobrenadante era deixado em banho-maria a 37° C o tempo suficiente para evaporação total do clorofórmio, distribuido em pequenas porções e a seguir congelado e conservado a -30° C até o momento de usar.

O antígeno de cultura de tecido era o próprio fluido de cultura de rim de vitelo infectada com vírus aftoso. A colheita do fluido era feita 18 horas após o tecido ter sido infectado. Êsse fluido era imediatamente congelado e só descongelado no momento de usar, quando era centrifugado para afastar detritos celulares.

Complemento: Tanto para a imunoaderência como para a fixação de complemento usamos sempre complemento de cobaia. O sôro de 20 a 30 cobaias adultas era misturado e distribuído em tubos com 1,2 ml em cada, e a seguir congelado e assim conservado até o momento de usar. Para a fixação de complemento, êste era dosado, e usado na diluição que desse 50% de lise, quando se trabalhava com glóbulos de carneiro na centração de 1 bilhão/ml.

Para o teste de imunoaderência utilizamos geralmente complemento diluído a 1:40, pois esta dose foi capaz de revelar menor quantidade de antígeno, não mostrando, por outro lado, nenhum efeito inespecífico.

Glóbulos humanos: Durante todo o desenvolvimento dêste trabalho usamos para a reação de imunoaderência glóbulos humanos do tipo "O", proveniente de um mesmo indivíduo. O sangue era recolhido em igual volume de solução de Alsever e conservado em geladeira comum até 1 mês. No momento de usar era retirada uma certa quantidade que era centrifugada e lavada 3 vêzes com tampão barbiturato.

A suspensão a 1,5% de glóbulos era padronizada de maneira a dar uma leitura de D. O.. 320 em 550 λ quando lisadas a 1:10 em água destilada (Espectrofotômetro Coleman Jr.).

Glóbulos de carneiro: Sangue de carneiro recolhido assèpticamente em solução de Alsever e só usado após 3 dias. No momento de usar sofria o mesmo tratamento descrito para os glóbulos humanos. A suspensão de glóbulos de carneiro a 5% era padronizada de maneira a dar uma leitura de D. O.. 560 em 550 λ (aproximadamente 1 bilhão de glóbulos por ml) quando lisada 1:15 em água destilada. Êsses glóbulos assim padronizados eram sensibilizados com igual volume de amboceptor durante 30 minutos a 37° C. A diluição de amboceptor empregada correspondia à dose máxima sensibilizante.

Diluente: Usamos como diluente o tampão barbiturato adicionado de 0,00015 M de Ca e de 0,0005 M de Mg e 0,1% de gelatina (*4*).

Técnica da reação de imunoaderência: Usamos tubos 12 × 120 mm, com um volume final de 0,7 ml assim distribuidos:

0,2 ml de sôro
0,2 " " antígeno
0,2 " " complemento
0,1 " " glóbulos humanos

Tôdas as operações relativas a diluição e distribuição dos reativos acima enumerados foram feitas em banho gelado para evitar qualquer deteriorização do complemento.

Misturamos o sôro, antígeno e complemento e incubamos durante 60 minutos a 37° C. Após êsse tempo juntamos os glóbulos humanos padronizados e incubamos novamente a 37° C durante 1 hora, com agitação eventual durante os primeiros 10 minutos. Após êsse tempo deixa-se à temperatura ambiente por mais 30 minutos e em seguida procede-se à leitura, considerando-se 4 o máximo de hemaglutinação e 0 a ausência da mesma. As anotações 1,2 e 3 referem-se aos graus intermediários.

Técnica da reação de fixação de complemento: A fixação era feita a 4° C durante 20 horas na presença de 2 unidades de complemento 50% hemolíticas (2C'H50). O volume total na primeira fase da reação era de 1,3 ml. assim distribuidos:

0,2 ml de sôro
0,2 " " antígeno
0,4 " " complemento
0,5 " " tampão

Após a incubação a 4° C durante 20 horas eram adicionados 0,2 ml de glóbulos sensibilizados e novamente incubado a 37° C durante 1 hora. Findo êsse tempo, os tubos eram centrifugados a 1500 r.p.m. durante 10 minutos e a leitura feita comparativamente, a ôlho nu, com uma escala de lise prèviamente preparada.

RESULTADOS

O objetivo principal do presente trabalho foi verificar a possibilidade da aplicação da reação de imunoaderência na tipificação do vírus aftoso. Para isso tivemos preliminarmente de estabelecer as condições ótimas para a sua execução.

Temperatura: Incubamos o sistema nas temperaturas de 37° C e 4° C. Selecionamos essas temperaturas por serem as comumente usadas nas diferentes técnicas de fixação de complemento. Os resultados que obtivemos demonstram que a 4° C não se processa a reação, que é inteiramente negativa após 20 horas de incubação.

Tempo de incubação: Comparamos os resultados que se obtêm, utilizando 30 ou 60 minutos de incubação a 37° C. Os resultados estão expressos na Tabela I.

TABELA I

Influência do tempo de incubação na reação de imunoaderência

37° × 30 minutos							37° C × 60 minutos							
Sôro C dil.	Antígeno "C" 1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	Contr. sôro	Sôro C dil.	Antígeno "C" 1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	Contr. sôro
1: 40	4	3	2	0	0	0	1: 40	4	4	3	1	0	0	0
1: 80	4	4	2	0	0	0	1: 80	4	4	4	3	1	0	0
1:160	0	0	0	0	0	0	1:160	3	3	3	0	0	0	0
1:320	0	0	0	0	0	0	1:320	1	0	0	0	0	0	0
1:640	0	0	0	0	0	0	1:640	0	0	0	0	0	0	0
Contr. antig.	0	0	0	0	0		Contr. antig.	0	0	0	0	0	0	

Como se depreende claramente da Tabela I, os melhores resultados são obtidos quando o sistema é incubado a 37° C durante 60 minutos, especialmente no que se refere à sensibilidade da reação.

Especificidade da reação: Outra verificação que fizemos foi relativa à especificidade dessa reação, seja utilizando antígeno preparado a partir de epitélio bovino, seja utilizando antígeno de cultura de tecido (Tabelas II e III).

TABELA II

Tipificação de vírus aftoso proveniente de epitélio bovino infectado.

Sôro, dil.	ANTIGENOS												Contr. sôro
	"A"				"C"				"O"				
	1:20	1:40	1:80	1:160	1:20	1:40	1:80	1:160	1:5	1:10	1:20	1:40	
anti-A 1: 40	4	3	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1: 80	4	4	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1:100	4	4	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
anti-C 1: 40	0	0	0	0	4	2	0	0	0	0	0	0	0
1: 80	0	0	0	0	4	4	0	0	0	0	0	0	0
1:100	0	0	0	0	4	4	0	0	0	0	0	0	0
anti-O 1: 40	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0
1: 80	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	0	0
1:100	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	0	0
Contr. antíg.	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

TABELA III

Tipificação de vírus aftoso proveniente de cultura de tecido

Sôro, dil.	Antígeno "C"					Contr. sôro
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	
anti-A 1:20	0	0	0	0	0	0
1:30	0	0	0	0	0	0
1:50	0	0	0	0	0	0
anti-C 1:20	4	4	4	0	0	0
1:40	4	4	4	2	0	0
1:80	4	4	4	3	0	0
anti-O 1:20	0	0	0	0	0	0
1:40	0	0	0	0	0	0
1:80	0	0	0	0	0	0
Contr. antíg.	0	0	0	0	0	

Os dados acima indicam claramente a grande especificidade da reação para qualquer dos dois tipos de antígenos. Além disso, pode-se notar que a reação ainda é positiva mesmo quando são empregadas diluições muito altas de antígeno ou de sôro.

Sensibilidade da reação: Outro ponto de interêsse que abordamos foi o da verificação da sensibilidade da reação de imunoaderência no sistema em estudo. Para tal fim comparamos os resultados que se obtêm utilizando essa reação e a fixação de complemento que é o método correntemente usado para tipificação do vírus aftoso. Trabalhamos, igualmente, com antígeno preparado com vírus de epitélio bovino e proveniente de culturas de tecido, e usamos uma diluição ótima de sôro, isto é, capaz de revelar menor quantidade de antígeno. Os resultados estão resumidos nas Tabelas IV e V, que exprimem uma experiência típica utilizando como antígeno vírus tipo "A". Resultados igualmente nítidos obtêm-se com tipos "C" e "O".

TABELA IV

Comparação entre fixação de complemento e imunoaderência com vírus aftoso "A" proveniente de epitélio bovino infectado

Fixação de Complemento							Imunoaderência							
Sôro, dil.	Antígeno "A" 1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	Contr. sôro	Sôro dil.	Antígeno "A" 1:2	1:4	1:8	1:32	1:64	1:128	Contr. sôro
anti-A 1:30	0	0	10	70	90	90	anti-A 1: 50	4	4	4	4	4	4	0
anti-C 1:80	50	90	90	90	90	90	anti-C 1:100	4	2	0	0	0	0	0
anti-O 1:20	20	40	90	90	90	90	anti-O 1: 40	4	3	0	0	0	0	0
Contr. antíg.	70	90	90	90	90		Contr. antíg.	4	2	0	0	0	0	

As cifras relativas à fixação de complemento exprimem a % de lise.

TABELA V

Comparação entre fixação de complemento e imunoaderência com vírus proveniente de cultura de tecido

(Vírus "A" de 13.ª passagem em cultura de rim de vitelo)

Fixação de Complemento							Imunoaderência								
Sôro, dil.	Antígeno "A" 1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	Contr. sôro	Sôro, dil.	Antígeno "A" 1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:128	1:256	Contr. sôro
anti-A 1:30	10	40	60	90	90	90	anti-A 1: 50	4	4	4	4	4	4	1	0
anti-C 1:80	90	90	90	90	90	90	anti-C 1:100	0	0	0	0	0	0	0	0
anti-O 1:20	90	90	90	90	90	90	anti-O 1: 40	0	0	0	0	0	0	0	0
Contr. antíg.	90	90	90	90	90		Contr. antíg.	0	0	0	0	0	0	0	

As cifras relativas à fixação de complemento exprimem a % de lise.

Os resultados acima expressos mostram nìtidamente a grande sensibilidade da reação de imunoaderência para o sistema estudado, bem maior mesmo, do que a da fixação de complemento.

DISCUSSÃO

As experiências acima referidas demonstram claramente que a reação de imunoaderência pode ser utilizada para a tipificação do vírus aftoso.

A simplicidade de sua execução, sua especificidade e sensibilidade permitem seu emprêgo na prática corrente. Nesse particular, parece-nos mesmo mais adequada do que a fixação de complemento, visto que sua maior sensibilidade permite a utilização de menores quantidades de sôro e a demonstração de concentrações mínimas de vírus.

Os animadores resultados obtidos pelo emprêgo da reação de imunoaderência para a tipificação do vírus aftoso permite-nos prever sua aplicação para o estudo de outros vírus, o que nos parece um promissor caminho para futuras investigações.

SUMÁRIO

A autora estudou a possibilidade da aplicação da reação de imunoaderência para a tipificação do vírus aftoso. Para tal fim estabeleceu as condições ótimas para a realização da mesma e determinou sua especificidade e sensibilidade. Comparou a reação de imunoaderência com a de fixação de complemento e verificou que a primeira é bem mais sensível o que permite demonstrar pequenas quantidades de vírus no material a examinar.

Por essas razões recomenda a autora o emprêgo dessa reação para a tipificação do vírus aftoso em laboratório.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Dra. Maria Siqueira por nos ter sugerido o tema do presente trabalho e pelo auxílio prestado durante a execução do mesmo. Agradecemos também à Dra. Maria Pereira de Castro por nos ter fornecido vírus aftoso de cultura de tecido.

TYPIFICATION OF FOOT AND MOUTH DISEASE VIRUS BY THE IMMUNE-ADHERENCE TECHNIQUE

Summary

Typing of foot and mouth disease virus was made by the immune-adherence technique. The specificity and sensivity of the reaction were studied, as well as the best conditions for its development.

The results obtained clearly demonstrated that the immune-adherence reaction is quite adequate for the typing of the foot and mouth disease virus both from bovine epithelium or tissue culture origin. The comparison of the immune-adherence reaction with the complement fixation test proved that the immune-adherence reaction is more sensitive than the complement fixation test and equally specific.

In view of the facility in performing the immune-adherence reaction the author suggests its application as a routine laboratory method for typing the foot and mouth disease virus.

BIBLIOGRAFIA

1 — Rieckenberg, H. — 1917 — Eine neue Immunitätsreaktion bei experimenteller Trypanosomen-Infektion: die Blutplättchenprobe. *Z. Immunitätsforsch.*, **26**: 53-64.

2 — Nelson, R. A. — 1952 — Le test d'immobilisation des tréponèmes et le phénomène de l'adhérence-disparition dans la syphilis. *Presse Méd.*, **60**: 1719-1721.

3 — Nelson, R. A. — 1953 — The immune-adherence phenomenon. *Science*, **118**: 733-737.

4 — Wallace, A. L., A. G. Osler & M. M. Mayer — 1950 — Quantitative studies of complement-fixation. V. Estimation of complement-fixing potency of immune sera and its relation to antibody-nitrogen content. *J. Immunol.*, 65: 661-673.

Vol. 26 — Artigo 19 Dezembro de 1959

OBSERVAÇÕES PRELIMINARES SÔBRE AS RAÇAS DE *PHYTOPHTHORA INFESTANS* NO ESTADO DE SÃO PAULO, BRASIL(*)

POR

A. Ciccarone(1), W. Black(2) e B. P. Bastos Cruz(3)

Com 2 tabelas no texto

A "requeima", causada por *Phytophthora infestans* (Mont.) De By. é provàvelmente a mais séria doença da batatinha e do tomateiro no Estado de São Paulo. A doença é considerada como destrutiva para tomateiros, em tôdas as fases de crescimento, enquanto que o prejuizo causado à batatinha é habitualmente menor nas primeiras fases, mas tende a tornar-se maior com a idade da cultura. Durante as epifitias faz-se necessário aos agricultores pulverizar as culturas freqüentemente, quase diàriamente, com compostos de cobre, maneb, ou zineb. Estas aplicações intensas de fungicidas são econômicamente possíveis por causa do alto preço de venda que alcançam as batatas e tomates; preços que são principalmente justificados pela dificuldade de contrôle desta e de outras doenças dessas culturas, como as causadas por *Corynebacterium michiganense* (E. F. Smith) Jensen, em tomate, e por *Pseudomonas solanacearum* (E. F. Smith) E. F. Smith, em batata.

A "requeima" freqüentemente ocorre nas áreas mais quentes (Vale do Paraíba) durante o inverno, e nas zonas frescas e altas durante o verão. Essa distribuição por estação, contudo, é sujeita a variações. No inverno de 1958, que foi mais moderado do que habitualmente, o parasita foi encontrado a diferentes altitudes, sem dificuldade, mas em alguns locais, tais como nos campos não irrigados do oeste de Ribeirão Preto, foi controlado pelas condições de sêca que prevaleceram. Andrade (*1*) fêz um cuidadoso estudo das condições de umidade em relação à doença, com o propósito de prever os surtos de "requeima" em tomatais de São Paulo.

Desde que as Instituições técnicas do Estado estão planejando um programa de multiplicação metódica de variedades resistentes

(*) Recebido para publicação em 18 de dezembro de 1959.

(1) Istituto di Patologia Vegetale, Universidade de Bari, Itália. Durante êsses estudos, A. Ciccarone foi um convidado (28 de junho 1958 — 10 de dezembro 1958) da Secção de Fitopatologia Geral, Instituto Biológico, São Paulo, Brasil, graças ao auxílio concedido pelo Conselho Nacional de Pesquisas.

(2) Scottish Plant Breeding Station, Pentlandfield, Roslin, Midlothian — Escócia. A identificação das raças foi realizada na Scottish Plant Breeding Station.

(3) Secção de Fitopatologia Geral. Instituto Biológico, São Paulo, Brasil.

à requeima, pareceu oportuno estudar quais as raças de *P. infestans*, que constituem as populações locais e investigar as relações entre as raças do fungo induzindo epifitias sôbre tomateiro e batatinha. Para esta investigação, o presente trabalho é uma primeira contribuição.

MÉTODOS E RESULTADOS

O fungo foi isolado em fatias de tubérculos de batata, sôbre as quais foi colocada uma gota de uma suspensão de zoosporângios em água bidestilada. Os esporângios empregados com êste propósito foram amadurecidos sôbre fôlhas de plantas coletadas no campo e mantidas em câmara úmida por 2 ou 3 dias, a 12-15° C. As fatias de batata inoculadas foram incubadas por 8 a 12 dias à mesma temperatura, e, delas o fungo foi repicado para um meio de cultura especial. Êsse meio é semelhante ao empregado por BLACK & MEZZETTI (*3*), ligeiramente modificado por nós.

Uma pitada (mais ou menos 0,5 g) de aveia em flocos (tôdas as marcas comerciais testadas foram igualmente satisfatórias) foi colocada em cada tubo de cultura (18 cm de comprimento e 0,8 cm de diâmetro); para cada tubo foram adicionadas 6-7 ml de meio líquido, contendo 20 g de ágar e 8 g de melaço de cana de açúcar em 1000 ml de água destilada. O ágar foi derretido em autoclave desligado ao alcançar uma atmosfera.

Os tubos de cultura foram arrolhados e esterilizados em autoclave a uma atmosfera. O pH do meio assim preparado é aproximadamente 7.

Dada a dificuldade de se encontrar em São Paulo o suco de legumes "V-8", o meio de cultura descrito acima provou ser um substituto satisfatório. Nêle obtivemos um grande crescimento de conídias e o fungo ficou preservado, em boas condições, por mais ou menos 50 dias a 12-15° C; depois disso foram feitas repicagens.

A maior dificuldade encontrada durante a preparação de culturas foi devida às altas temperaturas prevalescentes em São Paulo. Algumas das amostras do fungo morreram antes mesmo de chegarem ao laboratório e freqüentemente as altas temperaturas interferiram com o trabalho subseqüente. Em tais circunstâncias, observaram-se germinações anormais e teratológicas dos esporângios, conseqüentemente não viáveis. Algumas das colônias crescidas permaneceram fracas e evanescentes, mesmo depois de repetidas repicagens; outras chegaram a formar conidióforos, mas perderam sua patogenicidade, de modo que não puderam ser identificadas.

A identificação das raças do fungo nos isolamentos foi realizada pela Scottish Plant Breeding Station, empregando-se fôlhas des-

tacadas da série diferencial de hospedeiros de 16 genótipos de batata. Em diversos casos não se obteve resultado, devido à perda de patogenicidade da cultura. Por outro lado, as culturas de raças simples foram prontamente identificadas, enquanto que aquelas que continham misturas de raças, requereram testes adicionais para confirmar a identificação. A mistura mais freqüentemente encontrada foi das raças 3 e 3,4. Dessa mistura, foi automáticamente isolada a raça 3,4 sôbre o genótipo $R_3 R_4$ mas foi impossível isolar o componente — raça 3 — pelo mesmo método porque a raça 3,4 é capaz de atacar qualquer genótipo suscetível à raça 3. Embora se pudesse isolar a raça 3 por meio de culturas mono-esporângicas ou monozoospóricas, pareceu-nos suficiente a demonstração baseada no número de necroses e na esporulação do fungo em fôlhas do genótipo apropriado. Êsse mesmo método foi empregado para determinar a proporção relativa das raças individuais nas culturas que, no teste inicial, mostraram conter misturas das seguintes raças: 0 e 4; 4 e 3,4; 1,4 e 1,3,4.

Os resultados dos testes para a identificação das raças são apresentados na Tabela I.

Tabela I — Culturas de *Phytophthora infestans* do Estado de São Paulo(*)

Table I — Cultures of *P. infestans* from the State of São Paulo

Tubos de cultura	Data de colheita	Hospedeiro (**)	Localidade	Raça
1	25-7-58	Batata	Franca	1,4
2				4
3				4
4				4 + (3)
5				—
1	1-11-58	Batata	Jacareí	1,4
2				1,4
3				1,4
1	25-7-58	Batata	Mairiporã	2,3,4
2				4
3				4 + (3)
4				4 + 3,4

(*) As raças representadas entre parênteses ocorrem em proporções reduzidas.

(**) Todo o material colhido em tomateiro é da variedade Santa Cruz. As variedades de batatinha não foram indicadas dada a dificuldade de identificá-las.

Tubos de cultura	Data de colheita	Hospedeiro (**)	Localidade	Raça
1	8-7-58	Batata	Mairiporã	—
2				1,4 + (1,3,4)
3				—
4				1,4
5				1,4
6				1,4 + (3,4)
1	21-10-58	Batata	Piedade	1,4
2				1,4
3				1,4 + (3,4)
1	7-8-58	Batata	S. Paulo	4
2				4
3				4
1	21-10-58	Batata	Suzano	—
2				1,4
1	16-8-58	Tomate	Campinas	—
2				3 + (3,4)
3				3 + 3,4
4				3 + 3,4
5				3,4
1	12-8-58	Tomate	Campinas	3
1	4-9-58	Tomate	Iguaçu	—
2				3 + (3,4)
3				3 + 3,4
4				3
1	5-8-58	Tomate	Mairiporã	2,3,4
2				3 + (3,4)
3				3 + 3,4
4				3,4
5				—
1	14-7-58	Tomate	Pedrinhas (Assis)	1,4
2				3 + (3,4)
3				3,4
4				3
5				3,4
1	15-7-57	Tomate	S. J. dos Campos	0 + (4)
2				0
3				—
4				0
5				0
1	31-7-58	Tomate	Taubaté	3,4
2				3,4
3				3 + 3,4
4				3

De 19 de Janeiro a 3 de Julho de 1959, após ter A. Ciccarone deixado a Secção de Fitopatologia Geral do Instituto Biológico, outras culturas de *P. infestans* foram isoladas de batatinha e tomateiro de: Águas da Prata, São Miguel Arcanjo, Divinolândia, Sant'Ana do Parnaíba, Itapecirica e Ibiúna. As raças fisiológicas dessas culturas foram classificadas por W. Black.

Essas novas classificações confirmam inteiramente os resultados obtidos com as séries de culturas anteriores, citadas neste trabalho.

Nas culturas de *P. infestans* isoladas de batatinha esteve sempre presente a raça 1,4, que apareceu misturada à raça 4, nas culturas procedentes de Sant'Ana do Parnaíba e Itapecirica. Nos isolamentos de tomateiros encontrou-se sempre a raça 3, misturada à raça 3,4, que ocorre com menor freqüência.

DISCUSSÃO DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES

Os resultados apresentados na tabela I mostram que as seguintes raças de *P. infestans* foram constatadas no Estado: 0; 3; 4; 1,4; 3,4; 1,3,4 e 2,3,4.

Na tabela II apresentamos a freqüência com que elas foram encontradas, respectivamente, em batatinha e tomateiro.

Tabela II — Freqüência de ocorrência de raças de *P. infestans* em batatinha e tomateiro

Table II — Frequency of the occurrence of races of *P. infestans* on potato and tomato

Raça	Freqüência	
	Batata	Tomate
0	—	14
3	2	13
4	9	1
1,4	12	1
3,4	3	15
1,3,4	1	—
2,3,4	1	1

Por êsses dados, verifica-se que as culturas de batata foram atacadas principalmente pelas raças 4 e 1,4, enquanto que as raças 3 e 3,4 prevaleceram em culturas de tomateiro. A baixa freqüência

da raça 0, que foi encontrada sòmente em tomateiros de uma localidade, é consistente com uma observação anterior (*2*), em que foi demonstrado estar a freqüência dessa raça diminuindo em muitas áreas do mundo.

A raça 2,3,4 foi encontrada apenas uma vez em culturas de batatinha e uma vez em tomateiros, no município de Mairiporã. Esta limitada distribuição sugere um surto fraco dessa raça, e uma falta de sua preferência por determinado hospedeiro. A raça 1,3,4 foi encontrada em apenas uma cultura. Ocorreu como componente menor de uma mistura, com a raça 1,4 em batatinha, e a significância de sua presença não ficou bem clara.

A prevalência das raças 4 e 1,4 em batatinha e das raças 3 e 3,4 em tomateiros indica acentuadas preferências de hospedeiros e elas podem por isso ser classificadas como "hostic" (*6*). Segundo Wilson & Gallegly (*7*), não parece haver relação definida entre o comportamento das raças do fungo identificadas sôbre batatinha e sôbre tomateiro. Êsses autores observaram que isolamentos diferentes de uma mesma raça patogênica em batatinha pode produzir diferentes reações em tomateiros. Do mesmo modo, diferentes isolamentos de uma mesma raça patogênica em tomateiro podem reagir como raças inteiramente diferentes, em hospedeiros diferenciais de batata. No presente trabalho, entretanto, a classificação é baseada sòmente nas reações dos genótipos de batata.

Um dos aspectos interessantes dos resultados é a proporção relativamente alta de isolamentos constituídos de misturas de diferentes raças. Isto ocorreu mais freqüentemente em tomateiro, do que em batatinha, mas pode ser apenas uma coincidência. Parece, entretanto, que as preferências de hospedeiro não são suficientemente acentuadas para que os surtos de "requeima" em culturas de batatinha e de tomateiro, sejam independentes uns dos outros.

Dessas observações preliminares conclue-se que a distribuição das raças não é grandemente influenciada pela posição geográfica das localidades onde foi colhido o material, mesmo quando estas localidades são muito afastadas entre si e climàticamente muito diferentes.

Todos os testes para determinar a existência de diferentes grupos de compatibilidade nos isolamentos do Estado de São Paulo, e a compatibilidade dos isolamentos brasileiros com os europeus deram resultados negativos. Êsse fato sugere que as populações do fungo do Estado de São Paulo não se originaram diretamente do México onde o número de raças é muito grande e onde existem dois diferentes grupos de compatibilidade (*4*).

As raças até o momento encontradas em São Paulo não são numerosas e assemelham-se mais àquelas encontradas na Europa e América do Norte do que às observadas no Peru (5) onde a lista é extensa e onde foi observada a maioria das raças que atacam grande número de hospedeiros diferentes. Parece, portanto, que a população de *P. infestans,* que agora ocorre em S. Paulo, tem sido até certo ponto influenciada pela importação da doença com as batatas-sementes da América do Norte e da Europa.

RESUMO

Foi feito um estudo preliminar das raças de *Phytophthora infestans* (Mont.) De By., que ocorrem em culturas de batatinha e de tomateiro, no Estado de São Paulo, Brasil.

Nas culturas de batatinha, predominam as raças 4 e 1,4 enquanto que nas de tomateiro prevalecem as raças 3 e 3,4 do fungo. Isso indica que há uma acentuada preferência de hospedeiros, e sugere que as epifitias podem ser parcialmente independentes nas duas culturas.

As raças O; 1,3,4 e 2,3,4 foram também identificadas, mas têm distribuição muito limitada.

A população do fungo em uma mesma localidade muitas vêzes consiste em misturas de raças.

A ocorrência das raças componentes das populações não é influenciada pela posição geográfica das localidades onde o material foi coletado, mesmo tratando-se de localidades afastadas e de climas diferentes.

Experiências feitas em cultura, com os isolamentos do fungo do Estado de São Paulo cruzando-os com isolamentos europeus mostraram que pertencem a um só grupo de compatibilidade, isto é, ao mesmo grupo em que foram classificados os isolamentos europeus.

Discute-se brevemente a origem de *P. infestans* no Estado de São Paulo. A composição racial das populações do fungo parece ser mais próxima às da América do Norte e da Europa do que às do México ou do Peru.

PRELIMINARY OBSERVATIONS ON THE RACES OF *PHYTOPHTHORA INFESTANS* IN THE STATE OF SÃO PAULO, BRAZIL

Abstract

A preliminary investigation was made of the races of Phytophthora infestans (Mont.) De By. present on potatoes and tomatoes, in the State of São Paulo, Brazil.

Races 4 and 1,4 were found to be prevalent on potatoes and races 3 and 3,4 on tomatoes. This indicates strong host preferences and suggests that epiphytotics in these crops may be partly independent of each other.

Races 0; 1,3,4 and 2,3,4 were also found but were very limited in distribution.

Blight populations in single localities often consisted of mixtures of races.

The composition of the populations was not influenced by the geographical position of the localities where collections were made, although some of these localities were distant and climatically very different from each other.

Brazilian blight isolates, tested in culture, were found to belong to a single compatibility group, viz. the group in which the European isolates tested against them were classified.

The origin of P. infestans in the State of São Paulo is briefly discussed. The racial composition of the blight populations appears to resemble that of North America and of Europe rather than that of Mexico or Peru.

BIBLIOGRAFIA

1 — Andrade, A. C. de — 1951 — Bases para a previsão do aparecimento de surtos de "requeima" do tomateiro em São Paulo. *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo, **20**: 95-108.

2 — Black, W. — 1957 — Incidence of physiological races of *Phytophthora infestans* in various Countries, Scottish Soc. Res. Pl. Breeding Ann. Rep. 1957, 43-49.

3 — Black, W. & A. Mezzetti — 1950 — Biotipi di *Phytophthora infestans* De By in Italia, *Boll. Staz. Pat. veg.*, Ser. 3, **6** (1948), 123-127.

4 — Gallegly, M. E. & J. Galindo — 1957 — The sexual stage of *Phytophthora infestans* in Mexico. *Phytophathology*, **47**: 13.

5 — Quevedo, D. A. — 1958 — Resistência a nuevas razas de *"Ph. infestans"* en el Peru. Boletin N.º 70, Estacion Experimental Agricola de "La Molina", Lima, Peru.

6 — Waggoner, P. E. & J. R. Wallin — 1952 — Variation in pathogenicity among isolates of *Phytophthora infestans* on Tomato and Potato. *Phytopathology*, **42**: 645-648.

7 — Wilson, J. B. & M. E. Gallegly — 1955 — The interrelationship of Potato and Tomato races of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, **45**: 473-476.

Vol. 26 — Artigo 20 Dezembro de 1959

FUNGICIDAS PARA CONTRÔLE DA "QUEIMA DA FÔLHA" DE BATATINHA(*)

POR

C. A. Campacci & C. F. Oliveira Santos

Do Instituto Biológico de São Paulo

Com a estampa 18 e 3 tabelas no texto

A cultura de batatinha (*Solanum tuberosum* L.) da região paulista da Alta Sorocabana é fortemente atacada pela doença "queima da fôlha", também conhecida por "pinta preta" e "crestamento precoce", causada pelo fungo *Alternaria solani* (Ell. and G.) Martin Sor..

Os tratamentos usualmente praticados pelos bataticultores — pulverizações com diversos fungicidas à base de cobre — não têm assegurado um contrôle satisfatório da doença, na região. O alto poder patogênico do parasita nos leva a admitir a existência, aí, de uma ou mais estirpes de *A. solani,* diferentes das de outras regiões batateiras do Estado de São Paulo, o que será objeto de estudos futuros.

Em vista dêsses fatos e da importância econômica da doença na região, instalamos duas experiências de tratamento de batatinha com diversos fungicidas modernos.

REVISÃO DA LITERATURA

A literatura sôbre a ocorrência, importância econômica e estirpes de *A. solani* em batatinha é bastante pobre, pois a doença pouco ocorre nas principais culturas batateiras do mundo e não causa grandes prejuízos.

Rands (*2*) atribui a disseminação rápida da doença às condições climáticas: tempo quente e sêco (temperatura de 26 a 28° C), seguido por um período de umidade, favorece grandemente o ataque do fungo.

Muitas das estirpes dêsse fungo encontradas na Alemanha (*4*) são de fraco poder patogênico e as perdas por elas causadas são menores do que as produzidas nos Estados Unidos.

(*) Recebido para publicação em 28 de dezembro de 1959.

Teschner (*4*) realizou estudo "in vitro", baseado nos caracteres morfológicos e fisiológicos de 52 estirpes isoladas de fôlhas e tubérculos de batata. Do resultado das inoculações com essas estirpes, em 20 variedades de batata, concluiu-se que o grupo representado pelas variedades Allerfruheste Gelbe, Bintje e Erstling (Duke of York) é bastante suscetível à doença (67% de infecção); outro grupo, ao qual pertencem as variedades Ackersegen, Heida e Immertreu é bastante resistente (16% de infecção).

Na Índia (*3*) foram observadas duas formas de "queima da fôlha", que foram atribuídas a estirpes diferentes de *A. solani*. De acôrdo com os trabalhos ai feitos, houve aparecimento de dois tipos de sintomas: o primeiro, caracterizado por uma área necrótica, bem definida, parda; e outro, por uma área difusa, de coloração preta. Entretanto, nenhuma diferença morfológica, em meio de cultura, foi observada entre os dois isolamentos.

Bonde (*1*) realizou um estudo detalhado com 11 estirpes de *A. solani,* isoladas de tubérculos de diferentes regiões e pertencentes a diversas variedades. Levando em consideração as dimensões dos esporos e patogenicidade das diversas estirpes determinadas em meio de cultura, chegou à conclusão de que existe diferença entre elas. De acôrdo com êsse autor, a produção de novas estirpes na natureza tornará o problema de contrôle da doença mais difícil.

Indicam as observações que vimos fazendo que tal problema já existe. Baseado no ensaio da eficiência de determinados grupos de fungicidas no contrôle da "queima da fôlha" da batatinha, acreditamos na existência de estirpes de *A. solani* diferentes das existentes em outras regiões, onde os fungicidas são pouco eficientes.

Trabalhos anteriores realizados na Secção de Fungicidas vieram demonstrar, em determinadas regiões batateiras, a eficiência dos fungicidas à base de cobre (calda bordalêsa a 1%, cobre Sandoz, cuprosan azul e outros) no contrôle da "queima da fôlha". Entretanto, conforme ficou demonstrado no presente trabalho realizado na região agrícola de Presidente Prudente, os fungicidas que mostraram melhor comportamento foram aqueles pertencentes ao grupo orgânico (Dithane M-22, Dithane Z-78, e outros).

SINTOMAS DA DOENÇA E PREJUIZOS

A "queima da fôlha" ataca tubérculos, hastes e fôlhas.

Nas fôlhas, aparecem áreas mortas, mais ou menos circulares, pardo-escuras ou pretas, formando anéis concêntricos. As man-

chas novas são pequenas e pálidas; tornam-se mais escuras e irregulares com o desenvolvimento, podendo juntar-se formando extensas áreas mortas. Em caso de ataque intenso há o amarelecimento do tecido entre as lesões, dando como conseqüência um crestamento total da fôlha e, posteriormente, a sua queda.

As hastes de plantas muito atacadas tornam-se amarelecidas, podendo também aparecer lesões pardas.

Nos tubérculos, surgem manchas ou lesões superficiais, de coloração escura, com o contôrno circular ou irregular, rodeadas algumas vêzes por uma borda mais elevada.

Esta doença aparece em tôdas as culturas de batatinha do Estado de São Paulo, tanto no plantio da sêca como no das águas. Ocasiona pequenos ou grandes prejuízos, de acôrdo com a época da plantio e ataque do fungo, condições ecológicas durante o desenvolvimento da planta, eficiência dos fungicidas aplicados e região onde é plantada. Os prejuízos traduzem-se pelo número de manchas, principalmente nas fôlhas, reduzindo a sua capacidade de fotossíntese e produzindo a sua queda. A produção é afetada não só na sua quantidade como no tipo comercial de tubérculo produzido.

EXPERIÊNCIAS PARA O CONTRÔLE DA DOENÇA

MATERIAL E MÉTODO — Foram instalados dois campos experimentais em culturas de batatinha da sêca na região de Álvares Machado, em locais diferentes. Em ambos empregou-se a variedade Flava, cultivada de acôrdo com as técnicas ai comumente adotadas.

As experiências foram realizadas de modo a permitir a análise estatística dos resultados, empregando-se delineamento dos blocos ao acaso, com 6 repetições e 12 tratamentos. O primeiro foi plantado em 16-2-59, e, o segundo em 24-2-59.

Os fungicidas empregados no primeiro campo, com suas respectivas concentrações e princípios ativos, foram os seguintes: Calda bordalêsa a 1%; Ziracuivre a 0,4% (15% de ziram e 33% de cobre metálico); Cuprosan Azul a 0,5% (oxicloreto de cobre); Cobre coloidal a 0,25% (oxicloreto de cobre); Cobre Sandoz a 0,3% (óxido cuproso amarelo); Dithane M-22 a 0,2% (etileno bisditiocarbamato de manganês); Dithane Z-78 a 0,2% (etileno bisditiocarbamato de zinco); Zineb (23%) + Cuprosan Azul (77%) a 0,3%, (etileno bisditiocarbamato de zinco + oxicloreto de cobre); Zineb (50%) + Cuprosan Azul (50%) a 0,3%; Zineb (77%) + Cuprosan Azul (23%) a 0,3%; Brestan a 0,15% (trifenilacetato de estanho).

No segundo campo foram empregados os seguintes fungicidas: Calda bordalêsa a 1%; Ziracuivre a 0,4%; Miltox a 0,3% (20% de zineb e 37% de cobre); Blistox a 0,5% (oxicloreto de cobre); Cuprosan Azul a 0,5%; Cobre Sandoz a 0,3%; Dithane M-22 a 0,2%; Dithane Z-78 a 0,25%; Brestan a 0,15% e X-682 a 0,2% (produto experimental fornecido pela Du Pont).

Os tratamentos foram iniciados quando as plantas atingiram 15 a 20 cm de altura. No primeiro campo, tiveram início após 23 dias de plantio e foram repetidos de 11 em 11 dias, perfazendo o total de 5 tratamentos. A doença começou a aparecer após 32 dias quando a cultura já recebera um tratamento.

No segundo campo, atingiu a 8 o número dos tratamentos, iniciados depois de 41 dias e repetidos de 7 em 7 dias, de acôrdo com rapidez da germinação em conseqüência do grau de umidade do solo. A doença começou a aparecer após 72 dias de plantada a batatinha, quando já havia recebido quatro tratamentos com fungicidas.

A eficiência dos tratamentos com os diversos fungicidas foi avaliada pela contagem das plantas, classificando-as de acôrdo com a intensidade de manchas sôbre as fôlhas, folíolos e hastes. Foram dadas notas para cada planta de 0 a 4 de acôrdo com o seguinte critério:

nota 0 — plantas sem manchas;

nota 1 — plantas que apresentavam até 25% da parte aérea atacada;

nota 2 — plantas que apresentavam de 26-50% da parte aérea atacada;

nota 3 — plantas que apresentavam 51-75% da parte aérea atacada;

nota 4 — plantas que apresentavam 76-100% da parte aérea atacada.

Além disso, foi feito o levantamento de cada canteiro e a classificação comercial dos produtos, em peneiras de diversos diâmetros, de acôrdo com as normas da região.

RESULTADOS — Os quadros I, II e III nos mostram: a) percentagem de produção dos diversos tipos de batata; b) produção total e percentagem de infecção dos respectivos campos.

QUADRO I

Classificação comercial dos tubérculos do primeiro campo, obtidos com os diferentes tratamentos (expressa em percentagens nos diversos tipos)

Tratamentos	TIPOS(1)					
	Especial	1.ª	2.ª	3.ª	4.ª	Refugo
Dithane M-22 — 0,2%	26,31	36,84	22,48	7,17	5,16	2,04
Brestan — 0,15%	26,01	35,85	20,13	9,04	5,65	3,32
Zineb (77%) + Cuprosan Azul (23%) — 0,3%	23,54	33,63	25,22	8,96	5,60	3,05
Calda bordalêsa — 1%	21,58	33,83	26,48	9,33	7,00	1,78
Dithane Z-78 — 0,25%	21,33	31,67	12,14	9,50	4,75	20,61
Cobre coloidal — 0,25%	20,70	37,64	21,32	9,41	6,27	4,66
Ziracuivre — 0,4%	19,90	33,17	24,96	11,45	5,42	5,10
Cuprosan Azul — 0,5%	18,32	32,06	25,52	11,78	9,16	3,16
Zineb (23%) + Cuprosan Azul (77%) — 0,3%	17,76	35,52	26,31	10,52	6,57	3,32
Zineb (50%) + Cuprosan Azul (50%) — 0,3%	15,71	31,42	12,97	12,97	7,51	19,42
Cobre Sandoz — 0,3%	15,49	30,98	27,32	15,07	9,85	1,29
Testemunha	8,36	30,60	30,10	11,70	10,86	8,38

(1) Classificação feita em peneiras, de acôrdo com o sistema usado na região.

QUADRO II

Classificação comercial dos tubérculos do segundo campo, obtidos com os diferentes tratamentos (expressa em percentagem nos diversos tipos)

Tratamentos	Tipos(1)					
	Especial	1.ª	2.ª	3.ª	4.ª	Refugo
Dithane M-22 — 0,2%	16,42	23,28	46,57	7,22	2,70	3,81
Brestan — 0,15%	14,96	23,39	47,20	7,37	2,95	4,13
Cobre Sandoz — 0,3%	14,28	22,44	37,95	7,14	3,46	14,73
Calda bordalêsa — 1%	13,77	23,80	46,82	6,88	2,95	5,78
Cuprosan Azul — 0,5%	12,96	21,19	49,17	7,20	3,49	5,99
Dithane Z-78 — 0,25%	12,64	24,31	47,08	6,22	1,94	7,81
X-682 — 0,2%	11,74	24,10	47,16	7,75	3,77	5,48
Miltox — 0,3%	11,45	25,83	26,04	7,29	3,12	26,27
Geigy-oxicloreto — 0,5%	10,41	20,43	49,67	8,01	3,20	8,28
Ziracuivre — 0,4%	9,36	25,17	51,35	4,02	2,01	8,09
Cobre coloidal — 0,25%	8,91	10,65	51,52	6,95	5,86	16,11
Testemunha	8,65	23,23	49,10	13,62	5,17	0,23

(1) Classificação feita em peneiras, de acôrdo com o sistema usado na região.

QUADRO III

Produção e percentagem de infecção em relação aos diversos tratamentos

1.º CAMPO

Tratamentos	Produção (kg)	Infecção (%)
Dithane M-22 — 0,2%	114,016	86,76
Dithane Z-78 — 0,25%	102,622	91,63
Brestan — 0,15%	101,072	79,00
Zineb (77%) + Cuprosan Azul (23%) — 0,3%	96,481	90,50
Ziracuivre — 0,4%	95,178	92,75
Calda bordalêsa — 1%	94,631	95,25
Cuprosan Azul — 0,5%	86,762	94,68
Cobre coloidal — 0,25%	85,652	94,95
Zineb (23%) + Cuprosan Azul (77%) — 0,3%	84,834	96,10
Zineb (50%) + Cuprosan Azul (50%) — 0,3%	82,822	95,66
Cobre Sandoz 0,3%	76,632	92,90
Testemunha	65,744	98,98

2.º CAMPO

Tratamentos	(Produção (kg)	Infecção (%)
Dithane M-22 — 0,2%	141,263	83,38
Dithane Z-78 — 0,25%	125,842	79,40
Calda bordalêsa — 1%	123,816	75,81
Blistox — 50 — 0,5%	122,793	83,28
Ziracuivre — 0,4%	121,519	74,18
Cuprosan Azul — 0,5%	119,590	75,21
Brestan — 0,15%	117,339	30,30
Cobre Sandoz — 0,3%	116,615	80,75
X-682 — 0,2%	116,423	91,50
Miltox — 0,3%	116,128	79,51
Testemunha	114,288	95,36
Cobre coloidal — 0,25%	111,267	81,83

Análise estatística dos resultados — Foi efetuada a análise de variância dos dados referentes à percentagem de infecção transformados em arc.sen $\sqrt{x}$ e também dos números que exprimem a produção.

Infecção — No primeiro ensaio, a análise de variância revelou um efeito altamente significativo dos tratamentos.

Colocaram-se em primeiro plano os fungicidas Brestan e Dithane M-22, que não apresentaram diferença significativa entre si. O Brestan mostrou uma diferença significativa em relação ao Zineb (77%) + Cuprosan Azul (23%) e Dithane Z-78; em relação ao Ziracuivre, Cobre Coloidal, Cobre Sandoz, Cuprosan Azul, Zineb (23%) + Cuprosan Azul (77%), Calda bordalêsa, Zineb (50%) + Cuprosan Azul (50%) e Testemunha a diferença foi altamente significativa.

Apresentaram um comportamento intermediário: Zineb (77%) + Cuprosan Azul (23%), Dithane Z-78 e Ziracuivre, que mostraram diferença significativa em relação à testemunha.

Não se destacaram os fungicidas Cobre coloidal, Cobre Sandoz, Cuprosan Azul, Zineb (23%) + Cuprosan Azul (77%), Calda bordalêsa, Zineb (50%) + Cuprosan Azul (50%), que não mostraram, em relação à testemunha, diferenças estatìsticamente significativas.

Houve, também, no segundo ensaio, efeito altamente significativo dos tratamentos sôbre o contrôle da infecção.

Distinguiu-se no contrôle de *A. solani* o Brestan, que mostrou uma diferença altamente significativa comparado com os outros tratamentos.

Classificaram-se num plano intermediário os seguintes tratamentos: Ziracuivre, Cuprosan Azul, Calda bordalêsa, Dithane Z-78, Cobre Sandoz, Miltox, Cobre coloidal, Dithane M-22 e Blistox, que mostraram diferenças significativas em relação à testemunha e ao X-682.

Foi considerado ineficiente o X-682, que não apresentou uma diferença estatìsticamente significativa com a testemunha.

Produção — A análise de variância acusou um efeito altamente significativo dos tratamentos no primeiro ensaio.

Em relação à testemunha os tratamentos se distribuiram nos seguintes grupos:

1.º Grupo — Dithane M-22 e Dithane Z-78, que apresentaram uma diferença altamente significativa.

2.º Grupo — Brestan, Zineb (77%) + Cuprosan Azul (23%), Ziracuivre, Calda bordalêsa, Cuprosan Azul que mostraram diferenças significativas em relação à testemunha.

3.º Grupo — Cobre coloidal, Zineb (23%) + Cuprosan Azul (77%), Zineb (50%) + Cuprosan Azul (50%), Cobre Sandoz que não acusaram diferenças estatìsticamente significativas com a testemunha.

A análise da variância dos dados da produção do segundo ensaio não revelou um efeito estatìsticamente significativo dos tratamentos.

Classificaram-se na seguinte ordem decrescente de produção: Dithane M-22, Dithane Z-78, Calda bordalêsa, Blistox, Ziracuivre, Cuprosan Azul, Brestan, Cobre Sandoz, X-682, Miltox, Testemunha e Cobre coloidal.

Discussão — Com relação ao contrôle da doença destacou-se nitìdamente o Brestan; os outros tratamentos apresentaram resultados um pouco irregulares.

Quanto à produção, é interessante assinalar que houve um paralelismo entre os dois experimentos. Verifica-se, por exemplo, que o Maneb destacou-se em ambos, seguido pelo Zineb; e a classificação dos demais não foi afetada sensìvelmente.

Fazendo um estudo entre o contrôle da doença e a produção, conclui-se que o Brestan foi o melhor fungicida, embora não correspondesse a uma boa produção. No primeiro campo, a doença atacou mais cedo; mesmo assim, o Brestan acusou uma produção apreciável; no segundo campo a doença apareceu mais tarde e não afetou muito a produção e aqui o Brestan teve uma classificação inferior. Disso se conclui que o Brestan e o Cobre coloidal têm efeito fitotóxico (aliás, é conhecido na literatura que o Brestan não pode ser recomendado para o tomate devido à sua fitotoxicidade).

De acôrdo com os resultados obtidos em outras experiências, os ditiocarbamatos exercem uma ação estimulante da produção em conseqüência dos elementos menores — zinco e manganês — ou devido à sua reduzida ação fitotóxica. Disso resulta maior desenvolvimento dos tubérculos, produzindo tipos em maior percentagem de boa classificação comercial.

Outros fatos nos mostram que, de acôrdo com os resultados obtidos pela Secção de Fungicidas sôbre o contrôle de *A. solani* em tomateiro, os ditiocarbamatos não controlam satisfatòriamente essa doença quando comparados com os fungicidas cúpricos. Pode-se interpretar êsse fato como a existência de uma estirpe de *A. solani*, mostrando diferenças sensíveis à ação dos fungicidas. Na literatura americana há inúmeras citações a êsse respeito. Além disso, os trabalhos recentes demonstram a existência de raças fisiológicas dêste fungo, o que torna o problema mais complexo.

Das observações e dos resultados obtidos com êste estudo poderíamos sugerir um plano de tratamento contra a "queima da fôlha" alternando-se o Brestan com o Maneb ou mesmo com um fungicida cúprico. Êsse plano já está sendo executado em nossos ensaios atuais.

FUNGICIDES FOR THE CONTROL "EARLY BLIGHT" OF POTATO

Abstract

In view of the severe prevalence of potato "early blight" in the State of São Paulo, Brazil, and of the low efficiency of the usual fungicides, plus the possible presence of more than one strain of Alternaria solani, studies on the control of the disease by means of modern fungicides were perfomed in the Alta Sorocabana region. Two experimental fields were established and sprayed on two different occasions.

In the first field five applications of the fungicides listed below were started when the plants were 15-20 cm high and repeated every 11 days. Fungicides used: Bordeaux mixture 8:8:1 lb; Ziracuivre, 0,4% (copper metallic 33% and Ziram 15%); Cuprosan blue, 0,5%; Colloidal copper, 0,25% (copper oxychloride); Sandoz Copper, 0,3% (cuprous oxide); Dithane M-22, 0,2%; Dithane Z-78, 0,2%; Zineb (23%) + copper oxychloride (77%), 0,3%; Zineb (50%) + copper oxychloride (50%), 0,3%; Zineb (77%) + copper oxychloride (23%), 0,3%; Brestan, 0,15% (tin triphenyl acetate).

In the second field eight applications of the fungicides listed below were started when the plants were 15-20 cm high and repeated every 7 days. Fungicides used: Bordeaux mixture 8:8:1 lb; Ziracuivre, 0,4%; Miltox, 0,3% (20% zineb 37% metallic copper); Blistox-50 (copper oxychloride), 0,5%; Cuprosan blue, 0,5%; Sandoz Copper, 0,3%; Dithane M-22, 0,2%; Dithane Z-78, 0,25%; Brestan, 0,15% and X-682, 0,2% (experimental fungicide Du Pont).

The efficiency of the products was evaluated by grading the plants from 0 to 4 according to the number of the spots on the leaves. The potatoes were then harvested and evaluated both for quantity and commercial quality of the yield. The statistical analysis led to the following conclusions:

1) As regards the control of the disease, Brestan was shown to be the best. All the other products were inferior and gave inconsistent results.

2) As to yield, Maneb was outstanding in both fields, followed by Zineb.

3) Brestan and Colloidal Copper showed phytotoxic effects.

4) Dithane M-22 and Dithane Z-78 showed an apparent stimulating effect owing probably either to the presence of zinc and manganese or to their own action.

5) The inconsistency of some of the results in comparing with the results of other areas may suggest the possibility of the presence of more than one strain of ***Alternaria solani.***

Considering that in other areas of the State of São Paulo the copper fungicides were more efficient than the dithiocarbamate fungicides, further experiments were planned and are being conducted at this Institute in view of the importance of the problem.

BIBLIOGRAFIA

1 — Bonde, R. — 1929 — Physiological strains of *Alternaria solani*, *Phytopathology*, **19**: 533-548.

2 — Rands, R. D. — 1917 — Early blight of potato and related plants. Agricultural Experiment Station of Research University of Wisconsin. Research Bulletin **42**: 1-48.

3 — Report of the Division of Mycology — 1948 — Sci. Rep. agric. Res. Inst. New Delhi, pp. 79-88.

4 — Teschner, Gertrud — 1953 — Untersuchungen über *Alternaria solani*, den Hartfaule — Erreger der Katrtoffel und Fruchtfaule — Erreger der tomate. *Phytopath. Z.*, **21** (2): 133-162.

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

Estampa 18

Fig. 1 — Folíolos atacados pela "queima da fôlha".

Fig. 2 — Folíolo em grande aumento, mostrando detalhe da doença (anéis concêntricos).

Fig. 1

Fig. 2

Vol. 26 — Artigo 21 Dezembro de 1959

ENSAIOS DE LABORATÓRIO PARA O CONTRÔLE DA COCHONILHA VERDE NO CAFÉ — *COCCUS VIRIDIS* (GREEN) — COM EMPRÊGO DE DIVERSOS INSETICIDAS(*)

POR

D. Puzzi, A. Orlando
Do Instituto Biológico de São Paulo

G. Otero M.
Ministério de Agricultura y Ganaderia de Nicaragua (Bolsista da F. A. O.)

Com 1 tabela e 1 figura no texto

Assinalada pela primeira vez no Brasil em fins do século passado, a cochonilha verde — *Coccus viridis* (GREEN) — vem se constituindo em praga de importância para o cafeeiro. Não existem levantamentos sôbre a sua distribuição no Estado de São Paulo; todavia, baseados em consultas dirigidas ao Instituto Biológico, nestes últimos vinte anos, e em inspeções feitas em regiões cafeeiras, podemos concluir que a praga já se encontra bastante disseminada.

O inseto se localiza, geralmente, na página inferior das fôlhas e nos brotos novos da planta; nas fôlhas, fixa-se quase sempre ao longo das nervuras principal e secundárias. A fêmea adulta é de côr verde-claro, brilhante; tem forma ovalada e sua consistência é mole, por ser fracamente quitinizada; mede cêrca de 4 mm de comprimento por 2 mm de largura. O macho é desconhecido. A reprodução da espécie se processa por ovoviviparidade.

Segregando um líquido açucarado, o coccídeo atrai certas formigas, que formam ninhos na base das plantas; tal secreção favorece também o desenvolvimento da fumagina, causada pelo fungo *Capnodium* sp., que se espalha sôbre as fôlhas e galhos da planta.

Temos verificado, nos últimos tempos, que as mudas de cafeeiros produzidas por viveiristas, ou formadas nas fazendas, podem constituir focos iniciais de disseminação da praga nas lavouras com elas formadas ou replantadas, pois o ambiente úmido sombreado dos viveiros favorece o desenvolvimento e a multiplicação do inseto. Além disto, quando o ataque inicial ocorre em mudas novas, torna-se difícil ser constatada a presença do inseto que, em seu primeiro estágio, tem coloração verde mais claro, confundindo-se com a planta e passando quase despercebido.

Nas lavouras, a praga ocorre mais em "reboleiras" — áreas mais ou menos definidas — e raramente atinge tôda a plantação. Todavia,

(*) Recebido para publicação em 12 de novembro de 1959.

êstes focos tendem a se expandir, o que já começa a ser pressentido por muitos lavradores, os quais se interessam pelo seu contrôle.

Para combater a cochonilha verde do café, o Instituto Biológico tem indicado o tratamento clássico contra os coccídeos em geral, que consiste em pulverizações com óleos miscíveis.

Em face de aparecerem na literatura indicações de bons resultados conseguidos com outros inseticidas, principalmente fosforados (*1, 2, 3*), realizamos ensaios de laboratório com a finalidade de verificar a eficácia dos mesmos contra o *C. viridis*.

MATERIAL E TÉCNICA

Na experiência foram usados cafeeiros cultivados em vasos, medindo aproximadamente 80 cm de altura; eram plantas bastante uniformes quanto ao aspecto vegetativo e mantidas isentas de pragas.

Para serem utilizadas, as mudas foram infestadas com *C. viridis* retirados de fôlhas e galhos de plantas cultivadas em ambiente favorável ao seu desenvolvimento. Depois de infestadas, aquelas mudas foram postas em estufa, até que exibissem infestação abundante, capaz de oferecer resposta aos tratamentos com inseticidas a que seriam submetidas.

Quando isto aconteceu, mudas escolhidas ao acaso foram reunidas em grupos de 4 plantas e distribuidos em 11 tratamentos, com 4 repetições cada um. Os tratamentos aplicados, com as respectivas dosagens em princípio ativo dos inseticidas, foram os seguintes:

1 — Óleo miscível a 1%;
2 — Malathion a 0,15%;
3 — Malathion a 0,15% + óleo miscível a 1%;
5 — Parathion a 0,02%;
5 — Parathion a 0,02% + óleo miscível a 1%;
6 — EPN a 0,06%;
7 — EPN a 0,03% + óleo miscível a 1%;
8 — Sevin a 0,06%;
9 — Thiodan a 0,04%;
10 — Endothion a 0,035%;
11 — Testemunha.

Os produtos Malathion, Parathion e Thiodan foram utilizados na forma de concentrado emulsionável; EPN e Sevin, pó molhável; e Endothion, técnico.

As pulverizações de inseticidas foram feitas com um pequeno pulverizador manual, com capacidade de cêrca de 2 litros; em média, cada grupo de 4 plantas recebeu 400 ml do líquido, quantidade sufi-

ciente para borrifá-las completamente. Após os tratamentos, as mudas foram deixadas ao ar livre, em local protegido contra chuvas.

Sete dias depois, tempo considerado suficiente para medir a eficácia dos inseticidas aplicados, procedeu-se à contagem dos insetos vivos e mortos. Para isso, de cada planta foi cortado o ponteiro, com quatro fôlhas abertas; com um pincel passado sôbre os insetos, era provocado o seu eventual desligamento das partes atacadas. Foram considerados vivos os insetos que, com coloração verde-claro e ainda turgescentes, permaneciam prêsos às partes da planta; e mortos os que se desprendiam e eram recolhidos sôbre uma fôlha de papel branco.

DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Procedida a contagem dos insetos vivos e mortos, foi feito o calculo da porcentagem de mortalidade de cada repetição, depois transformado em arco seno $\sqrt{x}$, para ser analisada pelo método de variância (*1*). A tabela I reproduz tais resultados.

TABELA I

Resultados da competição de inseticidas para combater o *Coccus viridis* (GREEN) em cafeeiros, sete dias após a aplicação.

TABLE I

Results of an insecticide contest for the control of Coccus viridis (GREEN) *on coffee plants, seven days after apraying.*

Tratamento	Porcentagem média de mortalidade dos insetos	
	Números absolutos	Transformado em arco seno $\sqrt{x}$ (*)
Malathion 0,150% + Óleo 1%	99,7	88,64
EPN 0,030% + Óleo 1%	97,5	82,24
Malathion 0,150%	94,8	76,91
Parathion 0,020% + Óleo 1%	90,7	73,15
Parathion 0,020%	89,5	71,94
Sevin 0,060%	89,5	71,19
EPN 0,060%	83,0	65,85
Óleo 1%	78,5	62,83
Endothion 0,035%	52,0	46,14
Thiodan 0,040%	14,6	22,34
Testemunha	5,6	13,65

(*) Diferença significativa no nível fiducial de 1% — 8,51;
" " " " " de 5% — 6,33.

(1) Somos gratos ao DR. ANDERSON COELHO DE ANDRADE, chefe da Secção de Fungicidas, pela análise estatística dos dados.

Constata-se, inicialmente, que houve diferença altamente significativa entre todos os tratamentos e a Testemunha. Colocou-se em primeiro lugar, quanto à eficiência contra o *C. viridis*, o Malathion 0,150% + óleo 1%, que mostrou diferença significativa, no nível fiducial de 5% em relação ao EPN + óleo 1% e altamente significativa, no grau fiducial de 1%, em relação a todos os demais produtos.

À exceção de Endothion 0,035%, Thiodan 0,040% e de EPN 0,060%, todos os demais produtos — isoladamente ou em misturas com óleo — mostraram-se mais eficientes do que o óleo, produto até então recomendado para o combate a êste coccídeo; poucas perspectivas oferecem, isoladamente, aquêles três produtos, para um possível emprêgo como inseticidas destinados a controlar esta praga.

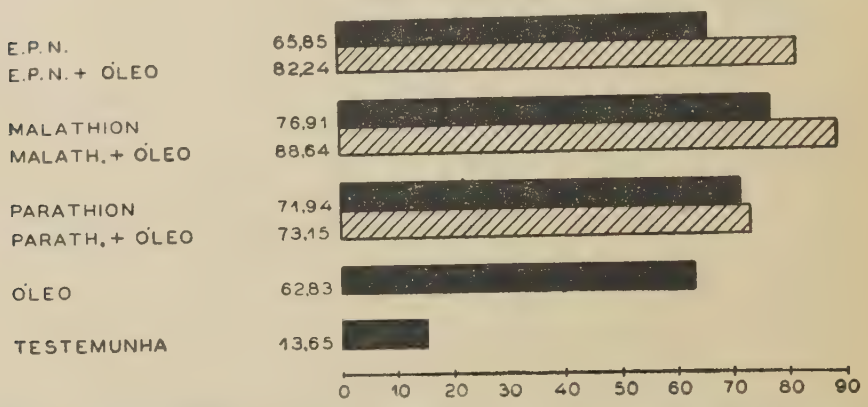


Fig. — 1 Comparação entre resultados obtidos com inseticidas aplicados isoladamnte e em mistura com óleo miscível e aplicação de óleo isoladamente, (nível fiducial de 1% — 8,51; nível fiducial de 5% — 6,53)

Quanto ao confronto entre os produtos isolados e recebendo a adição de óleo miscível, os resultados nos permitem algumas considerações, que servirão, pelo menos, como base para ulteriores ensaios. Constata-se na figura 1 (gráfico preparado com dados destacados da tabela I), que a adição de óleo ao EPN e ao Malathion asseguraram diferenças altamente significativas em relação ao emprêgo de cada um dêles, isoladamente; todavia, nenhuma diferença foi verificada entre o Parathion isolado e Parathion + óleo, o que justifica extranheza, porquanto em face de serem produtos de composição química muito próxima, deveriam se comportar do mesmo modo.

Cumpre, também, consignar que o maior aumento na eficiência contra a praga, assegurado pela adição do óleo ao EPN possa ser encontrada no fato de ser êste produto usado sob a forma de pó mo-

lhável, ao passo que do Malathion o Parathion foram empregados concentrados emulsionáveis.

Há indícios de uma ação sinérgica em tais casos; todavia, não foi o ensaio planejado para apurá-la, motivo pelo qual sòmente com estudos posteriores poderia ser a mesma posta em evidência.

Em face de tais resultados, poderíamos tirar as seguintes conclusões:

1 — Os tratamentos feitos com Malathion e Malathion + óleo, com EPN + óleo e EPN isoladamente, com Parathion + óleo e Parathion isoladamente e com Sevin, revelaram-se mais eficientes para o contrôle do *C. viridis* do que o óleo miscível, produto até agora recomendado para combater esta praga.

3 — A adição de óleo ao Malathion e ao EPN assegurou aumento de eficiência, altamente significativa no combate à praga, em relação ao emprêgo de cada um dêstes produtos isoladamente; nenhuma vantagem, no entanto, ficou evidenciada com a adição de óleo ao Parathion.

4 — Pesquisas complementares, visando apurar uma possível ação sinérgica do óleo adicionado aos inseticidas antes apontados, bem como observações sôbre dosagens diferentes de inseticidas para serem misturados com óleo, poderiam esclarecer melhor alguns pontos dêste trabalho.

LABORATORY TESTS WITH DIFFERENT INSECTICIDES FOR GREEN SCALE — *COCCUS VIRIDIS* (GREEN) — CONTROL

Abstract

Screen laboratory tests of several insecticides were made against Coccus viridis (Green), green scale, on young potted coffee plants.

The insecticides and the dosages of active ingredients were: Malathion 0,150%; Malathion 0,150% plus miscibles oil 1%; Parathion 0,20%; Parathion 0,20% plus miscible oil 1%; EPN 0,06%; EPN 0,03% plus miscibles oil; miscible oil 1%; Sevin 0,06%; Thiodan 0,04%.

With the excepction of EPN and Endothion that were used respectively as wettable powder and in water solution of technical compound, all the others were prepared from emulsion concentrats.

Four plants were used for each treatment and the mortality was determined after 7 days. The amount of liquid sprayed per plant was about 100 ml.

Best results were obtained with sprays of Malathion plus oil (0,15% + 1%), followed in decreasing efficiency by: EPN plus oil, Malathion, Parathion plus oil, Parathion, Sevin, EPN, oil, Endothion and Thiodan.

BIBLIOGRAFIA

1 — Cressman, A. W. & col. — 1949 — Tests with parathion for California red scale control. *Calif. Citrogr.* **34**: 332-351.

2 — Cressman, A. W. & col. — 1950 — Effectiveness of different concentrations of parathion alone and of oil with parathion to control red scale. *J. econ. Ent.* **32**: 610-614.

3 — Cressman, A. W. — 1957 — Light oil with parathion or malathion for control of black scale on oranges. *J. econ. Ent.* **50**: 593-595.

Composto e impresso nas
ESCOLAS PROFISSIONAIS SALESIANAS
Alameda Barão de Piracicaba, 560
São Paulo — Brasil

Composto e impresso nas
ESCOLAS PROFISSIONAIS SALESIANAS
Al. Barão de Piracicaba, 560
São Paulo — Brasil